

UNIVERZITET U BEOGRADU

FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE

Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla



Lazar Z. Milojević, dr vet. med.

**IDENTIFIKACIJA I FILOGENETSKA ANALIZA
HEPATITIS E VIRUSA KOD SVINJA NA
KLANICAMA U SRBIJI**

-Doktorska disertacija-

Beograd, 2021.

UNIVERSITY OF BELGRADE

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE

Department of food hygiene and technology



Lazar Z. Milojević, DVM

**IDENTIFICATION AND MOLECULAR
CHARACTERIZATION OF THE HEPATITIS E
VIRUS IN SLAUGHTER PIGS IN SERBIA**

-Doctoral dissertation-

Belgrade, 2021

MENTORI

Dr Mirjana Dimitrijević, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu

Dr Branko Velebit, naučni savetnik

Institut za higijenu i tehnologiju mesa, Beograd

ČLANOVI KOMISIJE

Dr Nedeljko Karabasil, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Sonja Radojičić, redovni profesor

Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu

Dr Andrej Kirbiš, redovni profesor

Veterinarski fakultet, Univerzitet u Ljubljani

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Veliko hvala prof. dr Mirjani Dimitrijević, mentoru, koja je u svakom trenutku bila tu da sasluša i da sa adekvatnim savetima reši svaku moju nedoumicu i problem. Bez njenog uloženog vremena i stručne pomoći, izrada ove disertacijeni bila bi daleko teža.

Dr Branku Velebit, mentoru i prijatelju, veliko hvala na svemu. Hvala na ukazanom poverenju, strpljenju i znanju koje je nesebično delio kako bi me uveo u ovaj čudesan svet. Vodio me je kroz sve izazove, od početka same ideje pa sve do kompletnog završetka disertacije, uvek sa već spremnim odgovorom i pre nego što bih i postavio pitanje.

Zahvaljujem se članovima Komisije, na učešću u komisiji za pregled, ocenu i odbranu teze kao i na doprinosu u izradi ove disertacije koji su dali svojim savetima.

Veliko hvala dr Vesni Đorđević na razumevanju, uvek vedrom duhu, nesebičnoj podršci, na stručnim, kao i životnim savetima koji za mene uvek imaju posebnu težinu.

Svojim kolegama sa Instituta za higijenu i tehnologiju mesa, a posebno sa odeljenja za mikrobiološka i molekularno-biološka ispitivanja dugujem zahvalnost za pomoć pri izradi ove disertacije. Privilegija je biti deo ovog Instituta i njegovog kolektiva.

Zahvaljujem nastavnicima i saradnicima sa Katedre za higijenu i tehnologiju namirinica animalnog porekla i Katedre za ekonomiku i statistiku Fakulteta veterinarske medicine za angažovanje, uloženi trud i stručnu pomoć u realizaciji ove disertacije.

Disertaciju posvećujem svojoj porodici kojoj ujedno dugujem i najveću zahvalnost. Roditeljima na svemu što su do sada za mene uradili, bratu na podršci. Anđeli na bezrezervnoj podršci, razumevanju i vedrom duhu, a Uni na nepresušnom izvoru snage i volje koja me nosi dalje.

Lazar Z. Milojević

IDENTIFIKACIJA I FILOGENETSKA ANALIZA HEPATITIS E VIRUSA KOD SVINJA NA KLANICAMA U SRBIJI

REZIME

Povećana urbanizacija stanovništva i trend sve učestalijih putovanja, potom transport životinja i globalna orijentacija tržišta hrane, samo su neki od faktora koji su dovode do širenja mnogih patogenih mikroorganizama u sve delove sveta. Među njima je svakako i virus hepatitisa E (HEV), koji predstavlja sve važniji problem za javno zdravlje u mnogim zemljama. Epidemiološkim studijama je ustanovljeno da je u zemljama Evropske Unije kontaminirana hrana dominantni put prenosa ovog oboljenja, kao i da su glavni izvori HEV-a domaće, divlje svinje i jelenska divljač. Identifikacija virusa uz pomoć savremenih molekularno-bioloških metoda ukazala je da kontaminirana hrana iz jedne države može daljim distribuiranjem izazvati pojavu bolesti bilo gde u svetu. U Republici Srbiji, gde je visoka stopa potrošnje svinjskog mesa, ne postoji dovoljno podataka o prevalenciji ovog virusa kod životinja, kao ni u mesu i proizvodima od mesa svinja, koji može predstavljati rizik po zdravlje krajnjeg potrošača.

U ovom istraživanju, tokom četiri sezonska perioda u jednoj godini, ispitano je 900 uzoraka jetre i 60 briseva sa površina i opreme iz tri klanice locirane u tri različita okruga na teritoriji Republike Srbije. Takođe su u istim okruzima istovremeno ispitani uzorci jetre iz maloprodaje (60).

Primenom molekularne metode RT-qPCR, prisustvo HEV-a ustanovljeno je kod 29% ispitivanih uzoraka jetri svinja poreklom sa klanica. U kategoriji svinja mlađih od 3 meseca, virus je utvrđen je kod 44% ispitanih uzoraka, dok kod svinja starijih od 6 meseci nije dokazano njegovo prisustvo. Takođe, prisustvo HEV-a utvrđeno je kod 22% uzoraka briseva sa površine i opreme. Najveći broj pozitivnih nalaza (50%) bio je Sremskom okrugu. Kod uzoraka jetri iz maloprodaje, od ukupno 60 testiranih, HEV otkriven je kod 3 (5%) uzorka.

Statističkom obradom dobijenih podataka utvrđeno je da pol nije u korelaciji sa HEV prevalencijom kod životinja. Za razliku od toga, potvrđena je različita geografska distribucija HEV-a. Najveći procenat pozitivnih uzoraka utvrđen je u Sremskom okrugu (49% kod ukupnog broja uzoraka i 73,5% kod uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca). Nasuprot tome, Šumadijski okrug imao je najmanji procenat pozitivnih nalaza na HEV (4,67% kod ukupnog broja uzoraka i 7% kod starosne kategorije mlađi od 3 meseca).

Ustanovljena je sezonska učestalost nalaza HEV-a kod svinja. Tokom godine utvrđena su dva pika u prevalenciji, koja se javljaju tokom zimske i letnje sezone.

Rezultati filogenetske analize pokazali su da postoji visok stepen sličnosti između izolata dobijenih u ovom istraživanju i već opisanih u svetu. Od 52 ispitana izolata, 43 (82,7%) pripadalo je subgenotipu HEV-3a, pri čemu je prosečna genetička udaljenost među njima iznosila 6,5%. Dva izolata (3%) pripadala su subgenotipu HEV-3c, njih šest (11,5%) svrstani su u HEV-2a, dok je jedan izolat (1,9%) pripadao genotipu 3, pri čemu nije bilo moguće odrediti njegov subgenotip (najsličniji HEV-3c, HEV-3h i HEV-3i).

Rezultati kvantifikacije pozitivnih uzoraka pokazali su da je tkivo jetre u proseku bilo opterećeno sa $4,41 \log_{10} (2,5 \times 10^4)$ genomskih kopija HEV po gramu tkiva. Broj genomskih kopija po gramu se tokom celokupnog perioda istraživanja kretao u intervalu od 1,0 do $9,16 \log_{10}$. Statističkom obradom dobijenih podataka o broju genomskih kopija po gramu, a na osnovu geografskog porekla uzoraka, utvrđeno je da je medijana najvećeg broja genomskih kopija po gramu bila u Sremskom okrugu ($4,30 \log_{10}$) i statistički je bila značajno viša u odnosu na preostala dva ispitivana okruga ($2,94 \log_{10}$ u Šumadijskom okrugu i $3,74 \log_{10}$ u Kolubarskom okrugu).

Ključne reči: *Virusi koji se prenose putem hrane, virus hepatitisa E, svinjska jetra, RT-qPCR, bezbednost hrane*

Naučna oblast: Veterinarska medicina

Uža naučna oblast: Higijena i tehnologija mesa

UDK broj: 619:636.4:616.36-002

IDENTIFICATION AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF THE HEPATITIS E VIRUS IN SLAUGHTER PIGS IN SERBIA

SUMMARY

Increased urbanization and change of the food market from locally oriented toward globally driven, has pushed policy makers to impose more stringent hygienic standards and various control strategies for pathogenic bacteria, viruses, and parasites. Foodborne illnesses caused by viruses are a significant and emerging global problem, and because of that, an important cause of reducing economic growth in many countries. Identification of the viruses by modern molecular-biological methods has indicated that contaminated food from one country by further distribution can cause disease anywhere in the world. Among them, certainly is hepatitis E virus (HEV), which poses growing public health problem in many countries. In industrialized countries (European Union), food is the main transmission route of this virus, while the most important animal reservoirs are domestic pig (*Sus scrofa domestica*), wild boar (*Sus scrofa*) and deer (*Cervidae*). Furthermore, pork livers and pork liver products are the most important sources of foodborne HEV. In the Republic of Serbia, where the rate of pork meat consumption is high, there are still scarce data on the prevalence of this virus in pork liver, meat and pork products, as well as an adequate answer to the main question of whether this virus can really pose a health risk to the end consumers.

In this study, a total of liver samples (N=900) and food-contact-material swabs (N=60) from three mid-size slaughterhouses located in three different districts in the territory of the Republic of Serbia were examined during one-year period. Next, liver samples (N=60) from the retail stores located within same districts were collected and examined independently from other samples and without any association to the samples sampled at abattoir, mentioned above.

Out of all samples tested, originating from three slaughterhouses, 261 samples (29%) were positive for HEV. Classified by age categories, HEV was discovered in 261 livers (44%) from < 3-month-old piglets in the examined counties, while HEV was not detected at all in pigs older than 6 months. HEV was detected in 13/60 (22%) swabs of food contact surfaces and equipment. HEV was found in 3 liver samples (5%) sampled at retail stores.

By statistical processing of the obtained results, we concluded that the gender was not correlated to the prevalence of HEV infection in animals. However, a different distribution of HEV by geographical area was confirmed. Among the three HEV-positive counties in Serbia, the highest prevalence was measured in Srymia County (49% of total samples and 73.5% of samples from 3-month-old pigs), while the lowest was noted in Šumadija County (4.67% of total samples and 7% of samples from 3-month-old pigs).

Seasonal patterns of HEV findings in pigs were determined. Two peaks of HEV RNA prevalence have occurred during the winter and summer seasons, respectively.

The results of phylogenetic analysis showed that there was a high genetic homogeneity between Serbian HEV sequences and European HEV sequences. Phylogenetic analysis of the 52 Serbian HEV strains, showed that 43 (82.7%) belonged to the HEV-3a subgenotype, with the average genetic diversity between them being 6.5%. Furthermore, two isolates (3%) belonged to the HEV-3c subgenotype, six of them (11.5%) were classified as HEV-2a, while one isolate (1.9%) belonged to genotype 3 but could not be assigned to any of known subgenotypes (most similar to HEV-3c, HEV-3h and HEV-3i).

The results of quantification of HEV positive samples showed that the average viral load of liver tissue was $4.41 \log_{10} (2.5 \times 10^4)$ genomic copies/g (gc/g). Level of viral contamination during the entire study period ranged from 1.0 to $9.16 \log_{10}$ gc/g. By processing of the obtained quantitative data, we determined that the highest median value was in Srymia County ($4.30 \log_{10}$ gc/g) and it was statistically significantly higher compared to other two counties ($2.94 \log_{10}$ gc/g in Šumadija County, i.e., $3.74 \log_{10}$ gc/g in Kolubara County).

Key words: *Foodborne viruses, hepatitis E virus, pig liver, RT-qPCR, food safety*

Major Field of Study: Veterinary Medicine

Special Field of Study: Meat Hygiene and Technology

UDC Number: 619:636.4:616.36-002

SADRŽAJ

| | |
|---|----|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. PREGLED LITERATURE | 3 |
| 2.1. Otkriće i istorijat virusa hepatitisa E | 3 |
| 2.2. Opšte osobine virusa hepatitisa E | 4 |
| 2.2.1. <i>Struktura i genom virusa hepatitisa</i> | 4 |
| 2.2.2. <i>Klasifikacija virusa hepatitisa E</i> | 5 |
| 2.2.3. <i>Replikacija virusa hepatitisa E</i> | 7 |
| 2.3. Putevi transmisije virusa hepatitisa E | 8 |
| 2.3.1. <i>Prenos HEV-a putem vode</i> | 8 |
| 2.3.2. <i>Prenos HEV-a preko hrane</i> | 9 |
| 2.3.3. <i>HEV kao uzročnik zoonoze</i> | 10 |
| 2.3.4. <i>Drugi putevi prenosa HEV-a</i> | 11 |
| 2.4. Epidemiološki podaci, klinička slika, patogenezna i imunološki odgovor | 12 |
| 2.4.1. <i>Infekcije kod ljudi prouzrokovane HEV-om</i> | 12 |
| 2.4.2. <i>HEV-a kod domaćih svinja</i> | 14 |
| 2.4.3. <i>Prisustvo HEV-a kod divljih svinja i jelenske divljači</i> | 16 |
| 2.4.4. <i>Prisustvo HEV-a kod ostalih vrsta životinja</i> | 16 |
| 2.5. Dijagnostičke metode | 17 |
| 2.6. Terapija i imunoprofilaksa kod infekcija prouzrokovanim HEV-om | 18 |
| 2.6.1. <i>Terapija infekcija kod ljudi prouzrokovanim HEV-om</i> | 18 |
| 2.6.2. <i>Vakcine protiv HEV</i> | 18 |
| 2.6.3. <i>Profilaksa</i> | 19 |
| 3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA | 20 |
| 4. MATERIJAL I METODE | 21 |
| 4.1. Prikupljanje i čuvanje uzoraka | 21 |
| 4.2. Razvoj i optimizacija metode za ekstrakciju i otkrivanje virusne RNK | 22 |
| 4.2.1. <i>Ekstrakcija virusne RNK</i> | 22 |
| 4.2.2. <i>Izolacija virusne RNK</i> | 23 |
| 4.2.3. <i>Otkrivanje RNK poreklom od HEV-a primenom RT-qPCR metode</i> | 23 |
| 4.3. Sekvenciranje dela genoma HEV-a | 24 |
| 4.4. Određivanje filogenetske srodnosti | 26 |
| 4.5. Kvantifikacija HEV-a poreklom iz jetri | 28 |
| 4.6. Statistička obrada dobijenih rezultata ispitivanja | 29 |
| 5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA | 30 |

| | |
|---|-----------|
| 5.1. Razvoj i optimizacija metode za ekstrakciju i otkrivanje virusne RNK | 30 |
| 5.2. Prisustvo i zastupljenost HEV-a..... | 31 |
| 5.2.1. Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a uzoraka jetri svinja na klanicama . | 31 |
| 5.2.2. Analiza distribucije HEV-a prema starosnim kategorijama svinja..... | 33 |
| 5.2.3. Analiza distribucije HEV-a na osnovu polova..... | 34 |
| 5.2.4. Analiza teritorijalne distribucije HEV-a | 35 |
| 5.2.5. Analiza sezonske distribucije HEV-a..... | 36 |
| 5.2.6. Analiza teritorijalne distribucije HEV-a po sezonama..... | 37 |
| 5.2.7. Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica..... | 41 |
| 5.2.7.1. Analiza distribucije HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica prema polovima | 41 |
| 5.2.7.2. Analiza teritorijalne distribucije HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica..... | 42 |
| 5.2.7.3. Analiza sezonske distribucije HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica..... | 43 |
| 5.2.7.4. Analiza teritorijalne distribucije HEV-a po sezonama uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica..... | 44 |
| 5.2.8. Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a iz uzoraka jetri iz maloprodaje..... | 48 |
| 5.2.9. Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a u uzorcima briseva površina i opreme sa linije klanja svinja..... | 49 |
| 5.3. Genetička identifikacija i filogenetska analiza izolata HEV-a..... | 52 |
| 5.4. Kvantifikacija pozitivnih HEV-nih uzoraka iz tkiva jetri | 57 |
| 5.4.1. Analiza broja genomskih kopija HEV-a prema okruzima | 57 |
| 5.4.2. Analiza broja genomskih kopija HEV-a prema sezonama | 58 |
| 5.4.3. Analiza broja genomskih kopija HEV-a tokom zime, a prema okruzima..... | 59 |
| 5.4.4. Analiza broja genomskih kopija HEV-a tokom proleća, a prema okruzima | 60 |
| 5.4.5. Analiza broja genomskih kopija HEV-a tokom leta, a prema okruzima | 61 |
| 5.4.6. Analiza broja genomskih kopija HEV-a tokom jeseni, a prema okruzima..... | 62 |
| 6. DISKUSIJA | 63 |
| 6.1. Prisustvo i zastupljenost HEV-a..... | 64 |
| 6.2. Genetička identifikacija i filogenetska analiza dobijenih izolata HEV-a..... | 69 |
| 6.3. Kvantifikacija pozitivnih HEV uzoraka iz tkiva jetri..... | 71 |
| 7. ZAKLJUČCI..... | 73 |
| 8. SPISAK LITERATURE..... | 75 |

1. UVOD

Namirnice animalnog porekla mogu sadržati širok spektar potencijalnih uzročnika oboljenja i kao takve mogu predstavljati rizik po zdravlje krajnjeg potrošača. Ukoliko kod ljudi nakon konzumiranja hrane dođe do poremećaja homeostaze i kada se razmatraju biološki prouzročivači disbalansa u organizmu, akcentat se u najvećem procentu slučajeva stavlja na bakterije, potom kvasce i plesni, parazite, a najmanje se pažnje posvećuje virusima. Iako se ova grupa mikroorganizama nalazi svuda oko nas, komplikovana izolacija virusa i veoma teško kultivisanje u laboratorijskim uslovima samo su neki od razloga zbog kojih virusi nisu imali značajnije mesto u razmatranju bezbednosti hrane. Poslednjih godina sa razvojem tehnologije, razvila se i metodologija kojom je omogućena lakša izolacija, potvrđivanje i kultivisanje ove vrste patogenih mikroorganizama. Opravdanu pažnju u svom izveštaju iz 2015, Evropska agencija za bezbednost hrane (*European Food Safety Authority* - EFSA) posvetila je virusima prenosivih hranom. EFSA tada navodi da su virusi najčešći uzročnici epidemija putem hrane. Simptomi koje se javljaju nakon infekcije ovim uzročnicima uglavnom su vezani za digestivni trakt (gastroenteritisi i hepatitisi), dok u nekim slučajevima mogu biti zahvaćeni i drugi organi u organizmu (srce, bubrezi). Među različitim virusima koji se prenose putem hrane i imaju značajnu ulogu u bezbednosti, svoje mesto pronašao je i virus hepatitisa E (HEV). U analizi nadzora HEV-a iz 2017. godine, Evropski centar za prevenciju bolesti (*ECDC*) izvestio je o povećanju broja potvrđenih slučajeva HEV-a kod ljudi u Evropi: sa 514 slučajeva u 2005, na 5.617 slučajeva u 2015. godini. Međutim, ostaje nejasno da li to predstavlja istinski porast incidencije HEV-a ili povećanje otkrivanja slučajeva usled sve veće svesti i testiranja na prisustvo ovog virusa.

Svetska zdravstvena organizacija (*World Health Organization* - WHO) na osnovu svojih raspoloživih podataka, ukazuje da se na godišnjem nivou virusna infekcija HEV-a dijagnostikuje kod oko 20 miliona ljudi u svetu, pri čemu Azija i Afrika predstavljaju regione sa najučestalijom stopom pojave ove bolesti. Oni su i okarakterisani kao endemski regioni za ovo oboljenje, gde HEV prouzrokovao mnoge epidemije, najčešće prenošen fekalno-oralnim putem, pri čemu je izvor infekcije većinom predstavljala kontaminirana voda. Ipak se sve češće beleže slučajevi oboljenja ljudi uzrokovani ovim virusom nakon konzumiranja kontaminirane hrane.

Ovaj virus prvi put izoluje se i potvrđuje kod životinja 1997. godine u Americi, iz uzoraka poreklom od svinja (*Meng i sar., 1997*). Nakon toga, dolazi se i do saznanja da ova bolest može imati zoonotski karakter. Otkrivena su specifična antitela kod ljudi koji su imali kontakt sa svinjama (*Meng i sar., 2002*). Takođe, dokazani su i sporadični slučajevi akutnog hepatitisa kod ljudi nakon konzumiranja sirove ili termički nedovoljno obrađene hrane (*Yazaki, 2003*). Patogeneza bolesti karakteriše se inkubacionim periodom koje se kreće u intervalu od 2 nedelje do 2 meseca (*Park i sar., 2016*). Klinička slika kod ljudi razlikuje se u zavisnosti od toka bolesti, ali se uglavnom manifestuje pojavom žutice, abdominalnim bolovima, mučninom i povraćanjem. Najrizičnija grupa su trudnice kod kojih je mortalitet značajno češći.

HEV pripada familiji *Hepeviridae*, a ova familija sastoji se iz dva roda: *Orthohepevirus* (koji inficira sisare i ptice) i *Piscihepevirus* (inficira pastrmke). Rod *Orthohepevirus* dalje se grana na četiri vrste A, B, C i D (*Smith i sar., 2014*). *Orthohepevirus A* najviše je zastupljena od svih vrsta ove familije virusa i obuhvata 7 genotipova. Samo genotipovi od 1-4 mogu da prouzrokuju oboljenje ljudi (*Doceul i sar., 2016*). Genotip 3 izolovan je širom sveta iz uzoraka poreklom od ljudi i svinja i predstavlja najčešće izolovani genotip u Evropi, kako kod ljudi, tako i kod svinja (*Rivero-Juarez i sar., 2017; Szabo i sar., 2015*).

Evropska agencija za bezbednost hrane u svom izveštaju 2017, iznosi mišljenje da su domaće svinje u prirodi osnovni rezervoar ovog virusa. Virus se među svinjama širi fekalno-oralnim putem. Relativno visok procenat pozitivnih uzoraka kod velikog broja istraživanja bio je znak da posebnu pažnju treba posvetiti ovom virusu, kao i putevima njegove transmisije do ljudi.

Jedan od najvažnijih puteva prenosa ovog virusa u razvijenim zemljama je preko hrane. HEV se najčešće prenosi na ljude konzumiranjem termički nedovoljno obrađenih jetri, proizvoda u čiji sastav ulazi jetreno tkivo, kao i proizvoda od mesa divljih svinja. Širom sveta zabeleženi su slučajevi obolevanja ljudi nakon konzumiranja navedene hrane (*Riveiro-Barciela i sar., 2015; Rivero-Juarez i sar., 2017; Yazaki, 2003; Li i sar., 2005*). Zaražene svinje mogu dospeti na klanicu, a budući da ne pokazuju vidljive simptome bolesti tokom *ante mortem* veterinarskog pregleda, upućuju se na klanje. Takođe, ovaj virus može se pronaći i u drugim organima kao što su limfni čvorovi i bubrezi. Potvrđena je i zoonotska transmisija ovog virusa sa svinja na ljude. Posebno je uočena veća seroprevalencija kod onih profesija ljudi koje imaju kontinuiran kontakt sa svinjama. Jedna od profesija kod kojih je uočena povećana seroprevalencija bili su i mesari koji rade u klanicama.

Identifikacija virusa uz pomoć savremenih molekularno-bioloških metoda ukazala je da kontaminirana hrana iz jedne države može daljim distribuiranjem izazvati pojavu bolesti bilo gde u svetu. Rizik od oboljevanja ljudi dodatno je povećan činjenicom da otkrivanje prisustva ovog virusa još uvek nije uključeno u obavezni plan monitoringa.

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Otkriće i istorijat virusa hepatitisa E

Virus hepatitisa E (HEV), kao uzročnik infekcija kod ljudi, prvi put se dokumentovano pojavljuje u periodu 1955-1956. godine (*Vishwanathan, 1957*). Utvrđeno je da je izvor izbivanja infekcije kod velikog broja ljudi bila zagađena reka Jumma u Indiji, koja je korišćena za navodnjavanje useva. U početku, epidemija je pripisana virusu hepatitisa A. **Wong i saradnici** (1980), zahvaljujući serološkim testovima ustanovili su da uzročnici ove epidemije nisu, u to doba već poznati, ni virus hepatitisa A (HAV) ni virus hepatitisa B (HBV). Mnogo godina kasnije ispostavilo se da je uzročnik bio HEV (*Purcell and Emerson, 2001*). Tokom 1978. u Kašmiru, u Indiji, izbila je epidemija žutice kod ljudi, koja se završila sa preko 600.000 obolelih osoba. **Khuroo** (1980) prvi postavlja sumnju da uzročnik, koga je karakterisala visoka prevalencija i procenat smrtnosti među trudnicama, ne pripada ni HAV, ni HBV. On je u svojim istraživanjima uspeo da dokaže da najveći procenat obolelih ljudi u serumu nije imao antitela protiv HAV i HBV. Takođe, Khuroo navodi da se virus prenosi fekalno-oralnim putem, kao i sa čoveka na čoveka i da opstaje među odraslima osobama, ne izazivajući hroničnu infekciju jetre (*Khuroo i sar., 1983*). Nakon toga, prijavljivane su epidemije sa sličnim simptomima u različitim zemljama: Nepal, Alžir, Mijanmar, Pakistan i Meksiko (*Kane i sar., 1984; Belabbes i sar., 1985; Hla i sar., 1985; Smego and Khaliq, 1988, Velazquez, 1990*).

HEV je prvi put identifikovan 1983. godine pomoću imuno-elektronske mikroskopije, a za ovaj uspeh bili su zaslužni **Balayan i saradnici**. Oni su istraživali izbivanje bolesti među sovjetskim vojnim dobrovoljcima koji su bili u Avganistanu, u vojnom kampu. Balayan je sebe inficirao tako što je konzumirao kompozitni uzorak fecesa obolelih vojnika i nakon određenog vremena dobio je karakteristične simptome za ovu bolest. Pomoću imuno-elektronskog mikroskopa uspeva da iz svoje stolice dobije sferičnu, virusu sličnu česticu, čiji je dijametar iznosio oko 27-32 nm. Ipak, mala količina virusnih partikula u uzorcima ovim istraživačima predstavljala je ograničavajući faktor za kloniranje i sekvenciranje virusa. **Reyes i saradnici** (1990) uspevaju da kloniraju deo virusa koji je poreklom iz žuči eksperimentalno inficiranih *Cynomolgus* majmuna. Budući da su do tada otkriveni, osim HAV i HBV, virus hepatitisa C (HCV [*Choo i sar., 1989*]) i virus hepatitisa D (HDV [*Rizzetto i sar., 1980*]), ovaj novi virus hepatitisa nazvan je virusom hepatitisa E. Slovo E predstavljalo je epidemiološke, endemske i enterične karakteristike ove bolesti (*Pérez-Gracia i sar., 2016*). Tokom 1991. **Tam sa saradnicima** uspeva da sekvencira ceo genom virusa. Takođe, tokom iste godine, razvijena je i imunoenzimska metoda za detekciju anti-HEV antitela zahvaljujući **Yarrough i saradnicima**.

Kod životinja, za razliku od ljudi, HEV se prvi put spominje kod svinja u Nepal. **Clayson i saradnici** (1995) otkrili su prisustvo RNK poreklom iz HEV-a i anti-HEV antitela, ali sam virus nije izolovan. Zbog toga se u naučnoj zajednici smatra da je HEV prvi put identifikovan 1997. godine kod svinja u Americi. Zasluge za to pripale su grupi istraživača na čijem je čelu bio **Meng**. Tokom svojih istraživanja ispitali su veliki broj svinja na farmama i ustanovili da virus prirodno opstaje kod većine odraslih jedinki. Kao potvrda ovoj hipotezi bila su antitela protiv HEV-a, čije prisustvo je utvrđeno kod ovih svinja. **Meng i saradnici** uspeli su da izoluju i sekvenciraju ovaj virus. Kako se on značajno razlikovao od virusa koji su prethodno izolovani kod ljudi u Aziji (genotip 1) i u Meksiku (genotip 2), dobija oznaku genotip 3. Nakon ovog otkrića, infekcija svinja HEV-om potvrđena je i u mnogim drugim zemljama sveta: Francuskoj, Češkoj, Španiji, Holandiji, Velikoj Britaniji, Novom Zelandu, Japan, Kanadi, Portugaliji, Nemačkoj i dr. Ustanovljeno je da su svinje osnovni, prirodni rezervoari HEV-a. Ipak, postojala je osnovana sumnja da i druge vrste životinja mogu biti inficirane ovim patogenom. Dokazane su infekcije kod pacova, zečeva, divljih svinja, ptica, riba, jelena, losa i drugih domaćih životinja (*He i sar., 2006; Zhang i sar., 2008; Zhao i sar., 2009; Forgách i sar., 2010;*

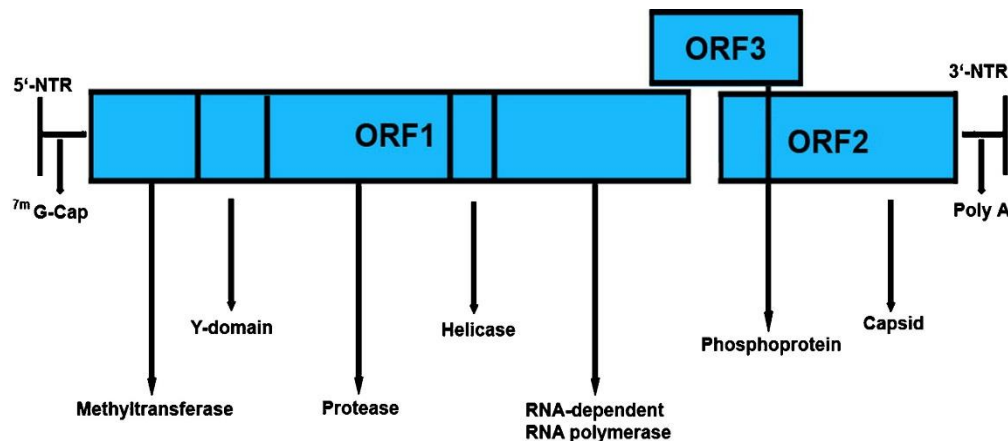
Batts i sar., 2011; Lin i sar., 2014; Kubankova i sar., 2015; Di Martino, 2016; Prpić, 2016; De Sabato i sar., 2019).

Porastom interesovanja naučne zajednice o ovom virusu, došlo je i do rasta broja istraživanja. a samim tim sticana su nova saznanja o ovom uzročniku, kao i samoj infekciji. Postepeno počinju da se pojavljuju i prve naznake da ova bolest može imati zoonotski karakter. Kod ljudi iz razvijenih zemalja koji nisu imali kontakt sa endemskim područjima, kao ni sa svinjama, otkrivena su specifična antitela. Nakon toga, ustanovljeno je da ljudi koji su imali kontakt sa svinjama imaju visok nivo antitela protiv HEV-a (*Meng i sar., 2002*). Takođe, dokazani su i slučajevi akutnog hepatitisa kod obolelih ljudi. Ovo su bili sporadični slučajevi i pojavili su se nakon konzumiranja sirovih ili nedovoljno termički obrađenih jetri svinja, kao i mesa divljih svinja (*Yazaki, 2003; Li i sar., 2005; Rivero-Juarez i sar., 2017*).

2.2. Opšte osobine virusa hepatitisa E

2.2.1. Struktura i genom virusa hepatitisa

Virusna čestica HEV-a sferičnog je oblika, bez omotača i dijametra od 27-32 nm (*Balayan i sar., 1983; Reyes i sar., 1990; Kamar i sar., 2012*). Virion ima ikosaedralnu simetriju (*Xing i sar., 1999*), a na površini mu se nalaze „šiljci i udubljenja“ (*Arankalle i sar., 1988*). Genom HEV-a čini jednolančana, pozitivno-orijentisana RNK, veličine od 6.6 do 7.3 kb (*Okamoto, 2011*). Daljom analizom RNK genoma HEV-a, može ustanoviti da se sastoji od 3 otvorena okvira čitanja (*Open Reading Frames*) ORF 1, ORF 2 i ORF 3. Osim ova tri ORF regiona, u sastav genoma ulaze još i kratki segment na 5' kraju, na kom se nalazi nekodirajući region (5'-NCR) kao i 3' kraj sa nekodirajućim regionom (3'-NCR). *Cap* struktura ustanovljena je na 5' kraju virusnog genoma i pretpostavlja se da ona ima značajnu ulogu u započinjanju replikacije HEV-a. ORF 2 region je segment genoma koji nikada ne prelazi preko ORF 1, međutim preklapa se sa ORF 3. Segment ORF 1 nalazi se na 5' kraju, završava na nukleotidnoj poziciji 5109 (*Panda i sar., 2007*) i čini skoro dve trećine celokupnog genoma. Ovaj deo genoma ima ulogu u kodiranju nestrukturnih proteina koji učestvuju u replikaciji virusa. Funkcionalni domeni takođe ulaze u sastav ovog regiona i oni u sebi sadrže informacije neophodne za sintezu: metiltransferaze, cistein-proteaze slične papainu, helikaze i RNK-zavisne RNK polimeraze. Region ORF 2 počinje od nukleotidne pozicije 5147 i pruža se sve do 7127 (*Panda i sar., 2007*). ORF 2 okvir čitanja koji se nalazi na 3' kraju, zadužen je za kodiranje kapsidnog proteina dužine od oko 660 aminokiselina (*Ricci i sar., 2017*). Ovaj protein poseduje 3 glikozidna imunogena epitopa koji indukuju stvaranje neutralizacionih antitela i podsticanje imunološkog odgovora. ORF 3 domen je najmanji, pruža se od nukleotidne pozicije 5107 do 5472. Ovaj ORF region preklapa se sa ORF1 i ORF2 kod većine genotipova HEV-a, osim kod genotipa 4, kod koga se ORF 3 preklapa samo sa ORF 2 (*Panda i sar., 2007*). Segment ORF 3 kod virusa koji pripadaju genotipovima 1, 2 i 3 kodira sintezu samo 123 aminokiseline, dok u genotipu 4 samo 114 aminokiselina. ORF 3 region ima i ulogu u kodiranju malog fosfoproteina, koji učestvuje u replikaciji virusa (*Okamoto, 2011*). Ovaj deo ima bitnu ulogu u mehanizmu nastanka bolesti izazvane ovim uzročnikom (*Chandra i sar., 2008*). ORF 3 antigen korišćen je za stvaranje prvog ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) testa za detekciju anti-HEV antitela (*Herremans i sar., 2007*).



Slika 1: Struktura genoma hepatitis virusa E
Kumar i sar. (2013)

2.2.2. Klasifikacija virusa hepatitis E

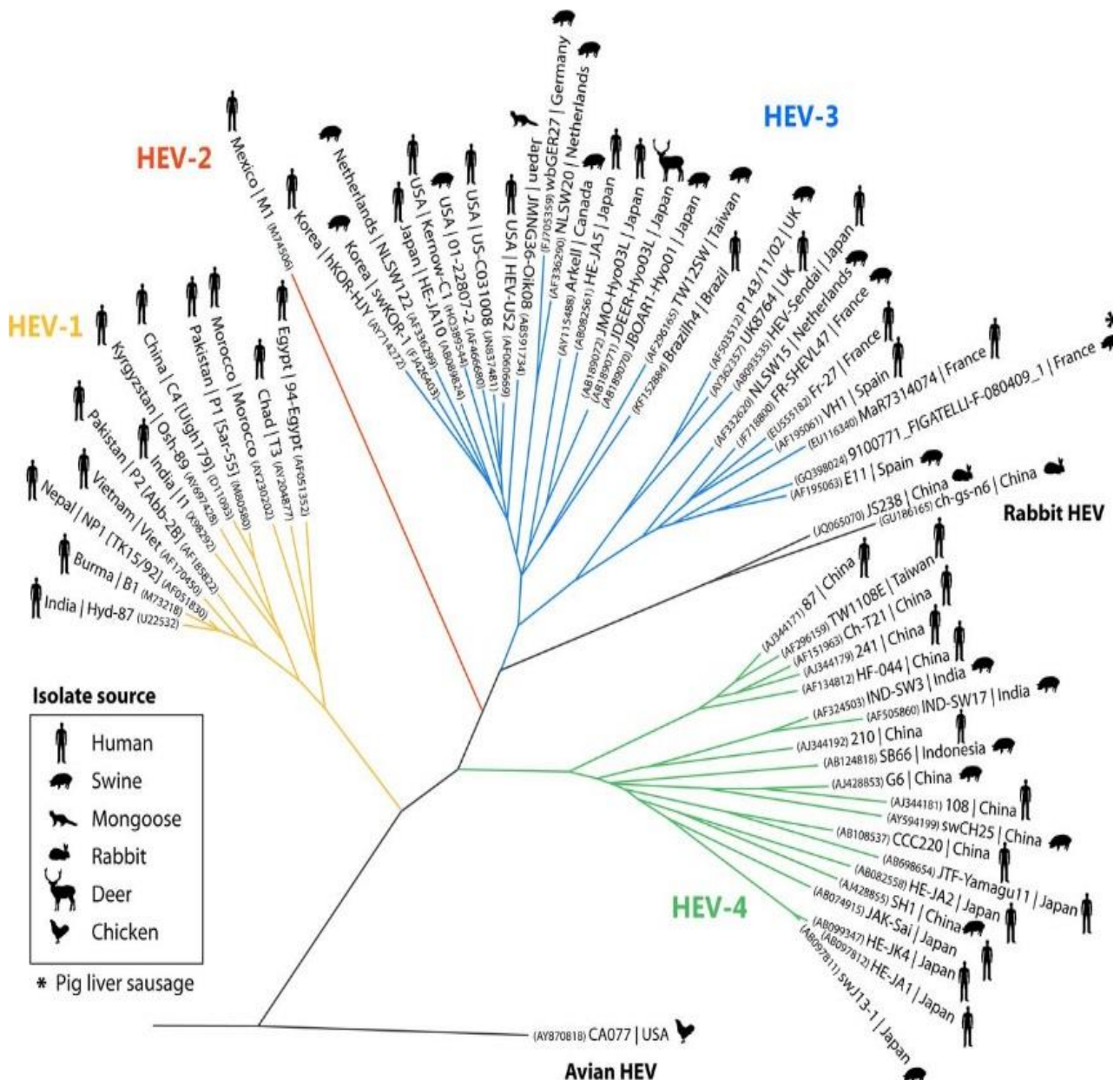
HEV pripada porodici *Hepeviridae*, grupi virusa koji imaju pozitivno orijentisan lanac RNK, a mogu da inficiraju veliki broj vrsta sisara, ptica i riba. Ova porodica sastoji se iz dva roda: *Orthohepevirus* (koji inficira sisare i ptice) i *Piscihepevirus* (inficira pastrmke). Najveći procenat do sada identifikovanih sojeva pripada rodu *Orthohepevirus*. Rod *Orthohepevirus* se dalje grana na četiri vrste A, B, C i D (Smith i sar., 2014). Danas postoji i grupa novoidentifikovanih sekvenci kojima još uvek nije dodeljena pripadnost vrsti (Doceul i sar., 2016). Prema Smith i saradnicima (2014), *Orthohepevirus B* podeljeni su u četiri podtipa, a oni se uglavnom otkrivaju kod kokošaka, to jest mladih jedinki (pilića). *Orthohepevirus C* dalje je podeljen u dva genotipa koji se uglavnom otkrivaju kod pacova (HEV-C1) i mesojeda (HEV-C2), dok je vrsta *Orthohepevirus D* otkrivena kod nekih vrsta slepih miševa. *Orthohepevirus A* je najviše istražena od svih vrsta ove porodice virusa. Ova vrsta obuhvata 7 genotipova, s tim da samo genotipovi od 1 do 4 mogu da prouzrokuju oboljenje ljudi (Doceul i sar., 2016). Genotipovi 3 i 4 zajednički su za ljude i životinjske vrste (Dalton i sar., 2016). Genotip 3 izolovan je iz uzoraka poreklom od ljudi i svinja širom sveta. Ovaj genotip predstavlja najčešće izolovani genotip u Evropi, kako kod ljudi, tako i kod svinja (Rivero-Juarez i sar., 2017; Di Bartolo i sar., 2015; Szabo i sar., 2015). Ovom genotipu takođe pripadaju i izolati poreklom od uzoraka divljih svinja i jelenske divljači (Montone i sar., 2019; Kukielka i sar., 2015). HEV 4 genotip najčešće je izolovan na Azijskom kontinentu (Lapa i sar., 2015). Međutim, dokazani su i sporadični slučajevi prisustva ovog genotipa na teritoriji Evrope (Hakze-van der Honing i sar., 2011; Bouamra i sar., 2014). Za razliku od prethodna dva, genotipovi 1 i 2 inficiraju samo ljude, obično preko kontaminirane vode (Purcell i Emerson, 2008). Genotip 1 svojstven je za Aziju i Afriku, dok je genotip 2 izolovan na teritoriji Meksika i Afrike.

Tabela 1. Predlog klasifikacije HEV-a prema **Smitu i sar.** (2014)

| Familija | Rod | Vrsta | Genotip | Domaćin - najčešća vrsta |
|--------------------|-----------------------|-------------------------|---------------|--------------------------|
| <i>Hepeviridae</i> | <i>Orthohepevirus</i> | <i>Orthohepevirus A</i> | Genotip - 1 | Ljudi |
| | | | Genotip - 2 | Ljudi |
| | | | Genotip - 3 | Ljudi, svinje |
| | | | Genotip - 4 | Ljudi, svinje |
| | Genotip - 5 | | Divlje svinje | |
| Genotip - 6 | Divlje svinje | | | |
| Genotip - 7 | Kamile | | | |
| | | <i>Orthohepevirus B</i> | B 1 – 4 | Kokoške |
| | | <i>Orthohepevirus C</i> | C - 1 | Pacovi |
| | | | C - 2 | Lasice |
| | | <i>Orthohepevirus D</i> | | Slepi misevi |
| | <i>Piscihepevirus</i> | <i>Piscihepevirus A</i> | | Pastrmke |

Ukoliko se razmatra sličnost između genotipova na osnovu nukleotidne strukture, **Lu i saradnici** (2006) zaključili su da između genotipa 3 i 4, kao i 1 i 2 postoji sličnost približno 75% u oba posmatrana slučaja. Izolati iz drugih međusobnih kombinacija ovih genotipova pokazuju manju sličnost u odnosu na dva prethodno navedena slučaja. Kada uporedimo sličnost između kokošijeg *Orthohepevirus B*, *Piscihepevirus* i *Orthohepevirus C* sa HEV-om poreklom od ljudi, možemo videti da se ona kreće od 38 do 57% (**Batts i sar., 2011**). HEV genotip 7 deli sličnost od 48 do 76% sa ostalim poznatim genotipovima HEV-a, a najveću sličnost pokazuje sa genotipom 3 izolovanim iz uzoraka koju su poreklom od jelenske divljači (**Woo i sar., 2014**). Uprkos velikoj heterogenosti među genotipovima HEV-a, čini se da svi oni ili bar većina njih pripada istom serotipu (**Arankalle i sar., 1995**).

Klasifikaciju pojedinačnih genotipova HEV-a u podtipove, prvi put predstavio je **Lu i saradnici** (2006). **Smith i saradnici** (2016) proširili su postojeću klasifikaciju na osnovu analize nukleotidnih p-rastojanja svih dostupnih kompletnih sekvenci genoma HEV-a i dodeljivanjem referentnih sekvenci za svaki podtip. Prema njihovoj filogenetskoj analizi, HEV-1 ima šest podtipova (1a-1f), koji su podeljeni u dve grupe. HEV-2 u dva podtipa (2a i 2b). HEV-3 ima deset podtipova nakon izuzeća pripadajućeg HEV klastera zečeva (3a-3j). Podtipovi genotipa 3 klasifikovani su u 2 grupacije: 3abchij i 3efg prema **Doceul i saradnicima** (2016) i **Smith i saradnicima** (2016). Genotip HEV-4 ima devet podtipova (4a-4i).



Slika 2. Filogenetsko stablo izolata HEV-a zasnovano na delu nukleotidne sekvence koja je zaduzena za kodiranje kapsidnog proteina <https://cmr.asm.org/content/27/1/139/F5>

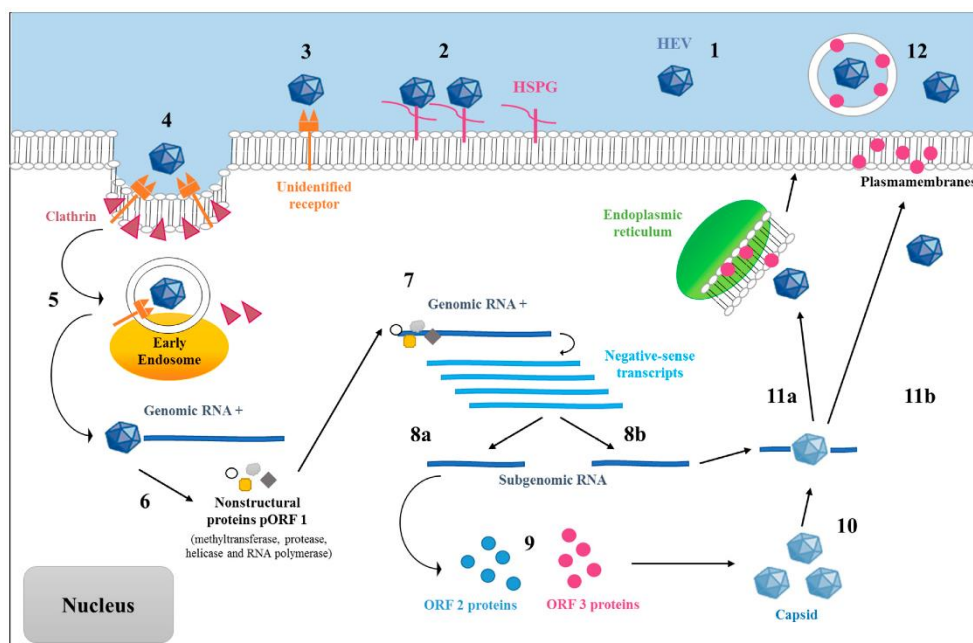
Celokupna analiza genotipova, podtipova i izolata urađena je na osnovu nukleotidne razlike i sličnosti u HEV sekvencama. Tako je **Doceul sa saradnicima** (2016) zaključio da u grupaciji 3abchij među podtipovima, na nukleotidnom nivou, postoje razlike od 3,5 do 17,3%. U grupaciji 3efg ona se kreće u rasponu 9,4-17,2%. **Lu i saradnici** (2006) zaključili su da između HEV-3 i HEV-4, u zavisnosti od dela genoma koji je sekvencioniran, razlika na nivou genotipa iznosi oko 18,8-28,2%, na nivou podtipova 11,4-22,8%, a na nivou izolata od 2,0 do 14,8%.

2.2.3. Replikacija virusa hepatitis E

Umnožavanje HEV-a na ćelijskim kulturama veoma je teško, budući da se ovaj virus u laboratorijskim uslovima veoma teško replicira. Ipak, postoje istraživanja u kojima su razvijeni i korišćeni modeli ćelijskih kultura za otkrivanje HEV-a (*Okamoto i sar., 2013; Berto i sar., 2013b;*

Meister i sar., 2019). Međutim, još uvek ne postoji dovoljno efikasna ćelijska kultura koja će služiti za detekciju i dijagnozu ovog virusa. Istraživanja povezana sa modelima ćelijskih kultura veoma su intenzivna i pitanje je trenutka kada će se pronaći model koji će pozitivno odgovoriti na sve potrebne uslove za umnožavanje HEV-a u laboratorijskim uslovima.

Model replikacije HEV-a (Slika 3) predstavljen je na osnovu poznavanja strukture genoma HEV-a i modela replikacije drugih poznatih RNK virusa. Ćelijski receptor za koji se HEV vezuje još nije poznat, a čini se da je za vezivanje virusa na ćelije neophodno prisustvo proteoglikana heparan sulfata. Pored toga, pojedina istraživanja sugeriraju da i C-terminalna regija ORF2 segmenta, takođe, ima ulogu prilikom ulaska virusa u ćeliju. Ulazak virusa u ćeliju postiže se vezivanjem za kognitivni protein 70 toplotnog udara (Hsc70) koji se nalazi na površini ćelije. Jednom kada se veže, HEV ulazi u ćeliju putem endocitoze. Nakon toga, RNK se oslobađa u citoplazmi ćelije, ali mehanizmi i tačna lokalizacija ovog procesa nisu dovoljno istraženi. Kada se virusna RNK oslobodi u citosolu, dolazi do translacije ORF1 poliproteina. Nakon toga, nastavlja se translacija drugih delova ORF1: metiltransferaze, proteaze, helikaze i RNK polimeraze. Zatim se genomska RNK kopira u negativni lanac RNK, koja omogućava sintezu genskih i subgenomskih RNK. ORF2 i ORF3 prepisuju se nakon toga i ovo omogućava dobijanje strukturalnih proteina (kapsidni protein i fosfoprotein) pomoću kojih dolazi do formiranja novog virusa. Pretpostavlja se da virus ćeliju domaćina napušta egzozomalnim putem (*Capai i sar., 2018*).



Slika 3. Šema modela replikacije hepatitis virusa E
Capai i sar., 2018

2.3. Putevi transmisije virusa hepatitisa E

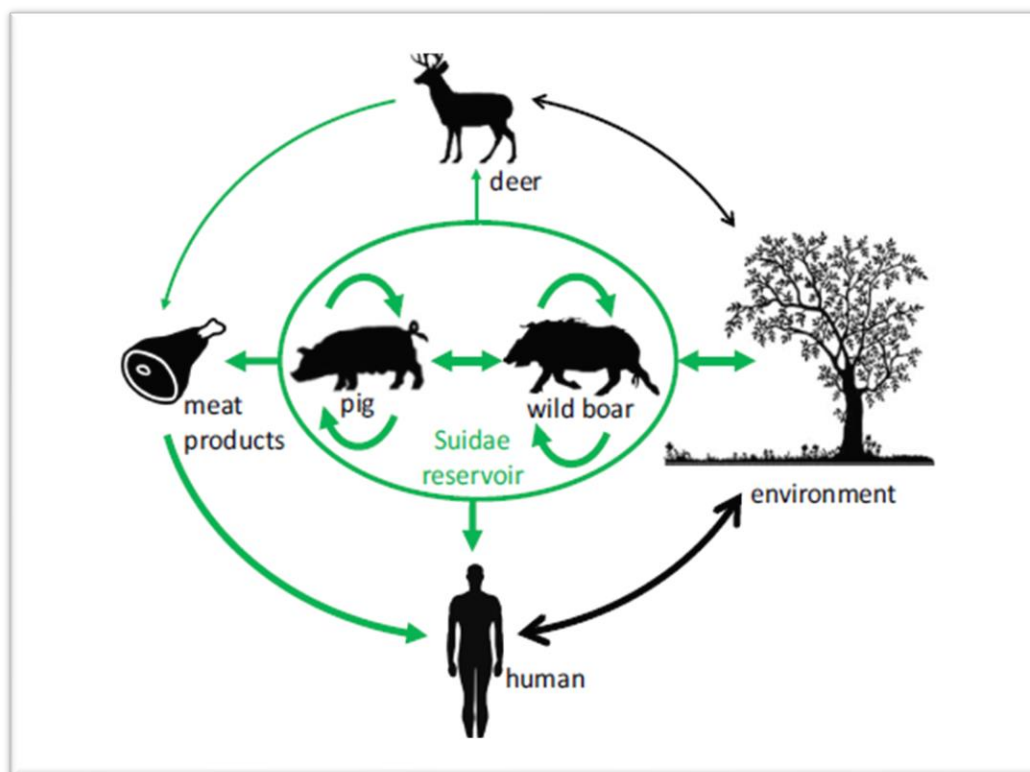
2.3.1. Prenos HEV-a putem vode

Prenos HEV-a putem vode predstavlja najranije utvrđeni put prenosa ovog virusa. Iz ranije objavljene naučne literature, može se uočiti da se preko vode najčešće prenose HEV genotipovi 1 i 2. Nerazvijene zemlje, posebno teritorije endemskih područja u Aziji i Africi, predstavljaju područja na kojima je najzastupljeniji prenos HEV-a ovim putem. Jedan od osnovnih izvora infekcija prouzrokovane HEV-om su prirodni izvori vode u zemljama koje nemaju dovoljno razvijene i

primenjene higijensko-sanitarne mere i koje takvu vodu, bez prethodnog kuvanja koriste za piće. Takođe, u regionima podložnim poplavama, često dolazi do mešanja fekalija sa izlivenom vodom i takva voda može predstavljati značajan izvor za izbijanja epidemija HEV-a.

2.3.2. Prenos HEV-a preko hrane

Nakon otkrića specifičnih antitela kod ljudi iz razvijenih zemalja koji nisu imali kontakt sa endemskim područjima, postavljeno je pitanje zoonotskog svojstva ovog virusa. U prilog ovom stavu išli su i rezultati u kojima je ustanovljeno da ljudi koji imaju kontakt sa svinjama imaju visok nivo antitela protiv HEV-a (*Meng i sar., 2002*). Rezultati većine istraživanja ukazivali su da postoji mogućnost prenosa HEV-a putem hrane. Istraživanja su stoga nastavljena u pravcu otkrivanja kategorija hrane preko kojih je moguć prenos virusa i koje bi predstavljale potencijalne izvore zaraze.



Slika 4. Putevi mogućeg prenosa HEV-a na čoveka
Pavio i sar., 2017

U istočnom delu Azije (Japan, Kina, Severna i Južna Koreja) stanovništvo ima specifičnu tradiciju konzumiranja sirovog ili termički nedovoljno tretiranog mesa i unutrašnjih organa. Tako su jedni od prvih zabeleženih i dokazanih slučajeva ljudi koji su bolovali od akutnog hepatitisa bili u Japanu (*Yazaki, 2003; Li i sar., 2005*). Prouzrokovani su konzumiranjem jetri domaćih, kao i mesa divljih svinja. Nakon toga, zabeleženi su i potvrđeni slučajevi oboljenja ljudi HEV-om nakon konzumiranja termički nedovoljno tretirane hrane poreklom do domaćih, divljih svinja i jelena. U Francuskoj su **Renou i saradnici** (2014) u svom istraživanju potvrdili su da je hepatitis kod obolelih ljudi izazvan HEV-om, a da su izvor infekcije bile tradicionalne korzikanske kobasice „Figatelli”. Istraživači u Španiji otkrili su slučajeve hepatitisa ljudi koji su se zarazili konzumiranjem kuvane prasetine, kao i mesa divljih svinja (*Riveiro-Barciela i sar., 2015; Rivero-Juarez i sar., 2017*). Zajedničko za sve ove slučajeve bila je veoma visoka procentualna sličnost analiziranih sekvenci RNK poreklom iz HEV-a (od 99,7 do 100%) izolovanih iz hrane i kod obolelih pacijenata. Takođe, postoji i veliki broj naučnih ispitivanja u kojima se na osnovu realnih zaključaka postavlja sumnja na

povezanost obolelih pacijenata HEV-om sa hranom koju su konzumirali, ali lanac transmisije nije u potpunosti dokazan. Tokom 2013. godine u tri regiona Francuske bilo je 17 prijavljenih slučajeva hepatitisa kod ljudi koji su konzumirali pečenu prasetinu (*Guillois i sar., 2015*). Takođe, u Francuskoj su zabeleženi slučajevi akutnog hepatitisa izazvanim HEV-om kod ljudi i koji se dovode u vezu sa konzumiranjem „Figtelli” kobasica (*Pavio i sar., 2014*). **Said i saradnici** (2013) u svojim istraživanjima došli su do zaključka da su infekcije prouzrokovane HEV-om u Velikoj Britaniji povezane sa konzumiranjem kobasica i šunki kupljenim u supermarketima. U Nemačkoj, autohtone infekcije prouzrokovane HEV-om ljudi povezane su sa konzumiranjem mesa divljih svinja (*Wichmann i sar., 2008*). U Mađarskoj je dijagnostikovao slučaj HEV-a kod jednog pacijenta koji se dovodi u vezu sa konzumiranjem kobasica (*Reuter i sar., 2006*).

Prisustvo HEV-a dokazano je takođe i na opremi (nož, masat, lodne) u lancu proizvodnje mesa svinja (*Di Bartolo i sar., 2012*). Takođe, **Di Bartolo i saradnici** (2012) ustanovili su da je RNK poreklom iz HEV-a prisutna u 3% ispitivanih uzoraka mesa svinja na teritoriji Češke, Italije i Španije. U Nemačkoj 20% uzoraka sirovih kobasica i 22% kobasica od jetre bilo je pozitivno na HEV prema podacima **Szabo i saradnika** (2015). **Moor sa grupom saradnika** (2018) prezentovao je rezultate istraživanja u kome su RNK poreklom iz HEV-a potvrđeni u 11,1% proizvoda od mesa i 5,7% ispitivanih uzoraka sveže kobasice u Švajcarskoj. Od 63 uzorka kobasica i salama od mesa divljih svinja sa tržišta u severnoj Italiji, HEV je ustanovljen u 4 uzorka (*Montone i sar., 2019*).

Postoje istraživanja koja čak navode povezanost između pojave akutne hepatitis infekcije ljudi i školjki koje su konzumirali za vreme svog putovanja na brodu (*Said i sar., 2009*). Takođe, primećeno je da radnici koji imaju kontakt sa živim školjkama u Kini imaju veći rizik od infekcija prouzrokovanim HEV-om od onih radnika koji nemaju kontakt sa školjkama (*Cui i sar., 2016*). Grupa kineskih naučnika u svom istraživanju takođe je iznela mišljenje o novom načinu prenosa HEV-a, to jest da se HEV može širiti i putem mleka poreklom od krava koje su inficirane ovim virusom (*Huang i sar., 2016*).

Voće i povrće predstavljaju još jedan mogući izvor HEV-a za ljude. U Kanadi otkriven je HEV 3 genotip u uzorcima jagoda (*Brassard i sar., 2012*). **Kokkinos i saradnici** (2012) u svojoj publikaciji objavljuju rezultate istraživanja po kom je u ispitivanim uzorcima salata u Poljskoj, Grčkoj i Srbiji otkriveno prisustvo HEV-a kod 3,42% ispitivanih uzoraka. Smatra se da voda, kojom je navodnjavano zemljište, predstavlja najverovatniji izvor kontaminacije voća i povrća virusom hepatitisa E.

Evropska agencija za bezbednost hrane (European Food Safety Authority - EFSA) tokom 2017. godine izdala je naučno mišljenje o HEV-u, u kojem se navode zaključci po kojima je u Evropi najčešći vid prenosa HEV-a na ljude putem hrane. Takođe se ukazuje da su domaće svinje glavni rezervoar HEV-a kod životinja.

2.3.3. HEV kao uzročnik zoonoze

HEV infekcija smatrala se karakterističnom za zemlje u razvoju. Ovakav stav dugo je opstajao, iako su povremeno publikovani radovi suprotnog mišljenja. Do promene u stavu naučne zajednice došlo je nakon opsežnog istraživanja koje su sprovedi **Meng i saradnici** (1997) u Americi. Ovi istraživači uspeli su da izoluju HEV na farmama svinja, karakterizuju ga i dokažu da je genotipski veoma sličan izolatima iz ljudi. Otkrili su da svinje zaražene HEV-om nisu imale kliničke simptome, ali su imale promene na mikroskopskom nivou, viremiju i prisustvo anti-HEV antitela. Rezultati ovih istraživanja doveli su u direktnu vezu HEV svinja sa oboljenjem HEV-a kod ljudi.

Veliki broj istraživanja sproveden je širom sveta sa ciljem da se utvrdi HEV seroprevalencija kod ljudi, kao i da se ustanovilo da li postoje razlike kod određenih profesija u odnosu na ukupnu populaciju ljudi. Tako je kod nekolicine istraživanja u Evropi utvrđena značajno veća seroprevalencija kod profesija koje imaju kontinuirani kontakt sa svinjama. U Norveškoj su veterinari koji rade sa svinjama imali značajno veću seroprevalenciju (22%) u odnosu na druge veterinare (9%) [*Lange i sar., 2016*]. Takođe, u Holandiji (*Bouwknegt i sar., 2008a*) prevalencija kod veterinara koji rade sa svinjama bila je gotovo dvostruko veća (11%) u odnosu na druge veterinare (6%). Značajno veća ($p = 0,008$) anti-HEV IgG seroprevalencija ustanovljena je u Portugaliji kod osoba koje imaju kontakt sa svinjama (30,7%) u poređenju sa opštom populacijom (19,9 %). U Estoniji, prema *Ivanovoj i saradnicima* (2015), uzgajivači svinja bili su znatno češće seropozitivni u odnosu na druge populacije. Prema *Caruso i saradnicima* (2016), uočena je značajna razlika unutar podgrupa, među osobama koje su bile kratkotrajno izložene (veterinari) u poređenju sa onima koji su radili duži period (farmeri). Rezultati su sugerisali da postoji pozitivna korelacija između vremena izlaganja i verovatnoće infekcije HEV-om. U Francuskoj, prema podacima istraživanja *Chaussade i saradnika* (2013), anti-HEV antitela otkrivena su kod 26% uzoraka krvi ljudi iz kontrolne grupe, dok je kod radnika na farmi svinja ona iznosila 44%. Seroprevalencija IgG anti-HEV antitela, prema *Riveiro-Barciela i saradnicima* (2012), iznosi oko 0,6-7,3% u opštoj populaciji u Španiji i 19% kod osoba sa rizičnim faktorima (kao što je izloženost svinjama). Takođe, procentualno veća seroprevalencija kod ljudi koji su bili u kontinuiranom kontaktu sa svinjama u odnosu na kontrolnu grupu utvrđena je i u Nemačkoj (*Krumbkolz i sar., 2014*). Radnici u klanicama, takođe, predstavljaju jednu od rizičnih populacija podložnih infekciji prouzrokovanoj HEV-om, što su potvrdili *Krumbkolz i saradnici* (2012) u svom istraživanju u Nemačkoj. Oni su dobili rezultate prema kojima je seroprevalencija anti-HEV antitela kod radnika u klanicama značajno veća (41,7%) u odnosu na kontrolnu grupu (15,5%).

Kod nekoliko individualnih slučajeva takođe je postojala opravdana sumnja na zoonotsku transmisiju sa životinje na ljude, ali ovaj vid prenosa nije dokazan. Izolat HEV-a pacijenta obolelog od infekcije prouzrokovane HEV-om u Francuskoj, imao je 92% homolognih sekvenci sa HEV-om koji je izolovan iz njegovog kućnog ljubimca, vijetnamskog praseta (*Renou i sar., 2007*). U Španiji je, takođe, utvrđen slučaj jednog radnika u klanici koji je oboleo od infekcije prouzrokovane HEV-om, a nije imao dodira ni sa jednim od faktora koji mogu izazvati HEV oboljenje (*Perez-Garsia i sar., 2007*). Analiza dela genotipa izolata obolelog radnika pokazala je da poseduje od 83,4 do 97,3% homolognih nukleotida sa ostalim evropskim sojevima poreklom od ljudi i svinja.

EFSA u svom naučnom mišljenju (2017) smatra da povećan rizik od infekcija prouzrokovane HEV-om imaju ljudi koji su u stalnom kontaktu sa svinjama (farmeri, veterinari, radnici u klanicama, mesari).

2.3.4. Drugi putevi prenosa HEV-a

Transfuzija, transplantacija organa i perinatalna transmisija takođe su mogući putevi prenosa HEV-a. Navedeni putevi prenosa ovog virusa nisu toliko često zastupljeni, ali su zabeleženi i potvrđeni kao mogući.

U svetu, do sada, postoji veliki broj istraživanja koja su se bavila prevalencijom HEV-a kod davalaca krvi. Najveći broj istraživanja prezentovan je u poslednjih nekoliko godina, većinom nakon objavljivanja izveštaja **ECDC** (2017). ECDC je u navedenom izveštaju predložio zemljama „skrining“ (praćenje) HEV-a u krvi u cilju dobijanja novih saznanja o prevalenciji HEV-a, kao i analize rizika po ljude. Od 28 članica Evropske Unije, njih 8 započelo je proces praćenja HEV-RNK kod donora (*Boland i sar., 2019*). Ova grupa istraživača navodi da je najveća prevalencija RNK poreklom iz HEV-a kod donora bila u Nemačkoj, Francuskoj i Holandiji. Među zemljama koje nas

okružuju postoje određeni podaci o seroprevalenciji HEV-a kod ljudi. Tako se u Grčkoj ona kreće do 9,7%; Albaniji 2-9,7%; do 20,9% u Bugarskoj; od 5,9 % do 17,1 % u Rumuniji i Hrvatskoj od 1,1 % do 24,5 % (*Mrzljak i sar., 2019*). U Srbiji nema dovoljno podataka o prevalenciji HEV-a, sem istraživanja **Petrovića i saradnika** (2014) koji su utvrdili da je prevalencija HEV kod testiranih davalaca krvi iznosila 15%.

Dokazi o postojanju HEV u krvi davalaca bili su prvi korak, dok bi sledeći bio utvrditi da li je moguće oboleti od HEV-a nakon transfuzije. Vremenom su zabeleženi podaci o pojedinačnim slučajevima u kojima se dokazuju mogućnost infekcije prozrokovane HEV-om kod ljudi putem transfuzije krvi (*Matsubayashi i sar., 2008; Dreier i sar., 2018*).

Razvoj tehnologija i saznanja donele su nam daleko veći procenat uspešnih transplantacija organa. Ipak, za uspešnu transplantaciju, jedan od osnovnih uslova je imati i organ koji je potpuno „zdrav“, bilo da se to odnosi na transplantaciju ili ksenotransplantaciju koja je sve prisutnija. HEV predstavlja jedan od uzročnika koji može nakon transplantacije da dovede do oboljenja pacijenta. Najčešće dokazana infekcija prouzrokovana HEV-om je nakon transplantacije jetre (*Pischke i sar., 2010; Kamar i sar., 2011*).

Perinatalna transmisija, takođe je jedan od mogućih vidova prenosa HEV-a. Dok je u razvijenim zemljama ona veoma retka, u zemljama u razvoju ovaj put prenosa može imati bitnu ulogu u infekciji ovim patogenom. Ispitivanje istraživača pokazuju visok procenat HEV seroprevalencije kod novorođenčadi (*Mushahwar, 2008; Zaki i sar., 2013*).

2.4. Epidemiološki podaci, klinička slika, patogenezna i imunološki odgovor

2.4.1. Infekcije kod ljudi prouzrokovane HEV-om

Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization - WHO) prema raspoloživim podacima, ukazuje da se na godišnjem nivou infekcija prouzrokovana HEV-om dijagnostikuje kod približno 20 miliona ljudi u svetu. WHO procenjuje da je u 2015. godini bilo oko 44.000 smrtnih slučajeva. Azija i Afrika predstavljaju regione sa najučestalijom stopom pojave ove bolesti i ovi regioni smatraju se za endemska područja ovog virusa. Procenjuje se da, samo u Indiji godišnje ima 2,2 miliona infekcija prouzrokovanih HEV-om (*Khuroo i Khuroo, 2016*). Kroz istoriju, za endemska područja, karakteristične su epidemije velikih razmera izazvane ovim uzročnikom.

Za razliku od endemskih područja, u razvijenim zemljama (većina zemalja Severne Amerike i Evrope) slučajevi oboljevanja ljudi javljali su se sporadično. Ovi slučajevi u početku su bili pripisivani putovanjima u endemska područja. Međutim, nakon izolovanja HEV kod svinja 1997, u Americi, kod ljudi su utvrđeni mnogi autohtoni sojevi HEV koji su karakteristični za mikro područje u kom su bili i otkriveni. Takođe je dokazano, zahvaljujući molekularno-biološkim metodama, da izolati ljudi i svinja iz istog regiona imaju veoma veliku međusobnu sličnost. Saznanja o ovome dovela su do zaključka o zoonotskoj transmisiji HEV-a. Nakon toga, HEV genotipovi 3 i 4, bivaju otkriveni i prijavljeni u velikom broju zemalja sveta (*Forgach i sar., 2010; Bouamra i sar., 2014; Renou i sar., 2014; Di Bartolo i sar., 2015; Szabo i sar., 2015; Rivero-Juarez i sar., 2017; De Sabato i sar., 2019; Montone i sar., 2019*).

Seroprevalencija kod ljudi u Evropi, na osnovu podataka koje je prijavilo 19 evropskih zemalja, pokazuje tendenciju rasta sa povećanjem starosne dobi. Tako je najveća zabeležena seroprevalencija kod ljudi starijih od 60 godina (*ECDC, 2017*). Prevalencija varira od zemlje do zemlje. Značajno veća seroprevalencija zabeležena je u zemljama centralne Evrope u odnosu na druge

regione Evrope. U Nemačkoj i Francuskoj prevalencija je bila 20% na ukupnoj populaciji stanovništva (*Faber i sar., 2012; Mansuy i sar., 2016*). Među zemljama na teritoriji Balkanskog poluostrva, seroprevalencija je varirala u odnosu na zemlju obuhvaćenu istraživanjem, regiona kao i ispitivane populacije. Tako je u Hrvatskoj otkriveno da je prevalencija 1,1-24,5%, Bugarskoj do 20,9%, 5,9-17,1% u Rumuniji, do 9,7% u Grčkoj, 2-9,7 % na teritoriji Albanije i 15 % u Republici Srbiji (*Mrzljak i sar., 2019*). Ukoliko se posmatra HEV seroprevalencija u Srbiji, nisu uočene značajne razlike između polova (14,6 % muški, 16,7 % ženski [*Petrović i sar., 2014*]). Ipak, uočeno je da seroprevalencija raste sa godinama, pošto je najveća bila kod osoba starijih od 51 godine (21,5 % [*Petrović i sar., 2014*]). Kako seroprevalencija može da varira u različitim regionima iste zemlje, postoje endemski regioni (visoka stopa obolelih slučajeva) i oni su specifični za tradiciju određenog, lokalnog stanovništva. Tako u južnom delu Francuske postoji područje u kome se konzumira sirova jetra i tu je seroprevalencija veoma visoka među testiranim donorima krvi. Na teritoriji centralne Italije, takođe, postoje područja gde je prevalencija daleko veća u odnosu na prijavljenu prosečnu nacionalnu seroprevalenciju koja je 0,7-9,1 % (*Lapa i sar., 2015; Hartl i sar., 2016; Tarantino i sar., 2016*). Populacije ljudi koje su izložene radu sa svinjama, divljim svinjama i jelenima imaju veću seroprevalenciju u odnosu na celokupnu populaciju (*Ivanova i sar., 2015; Hartl i sar., 2016*).

Francuska agencija za bezbednost hrane, životne sredine i zaštite na radu (ANSES, 2009) procenjuje da je oralna infektivna doza za ljude oko $10^{5.5}$ HEV RNA kopija po gramu. Ipak, infektivna doza, još uvek nije definitivno potvrđena. Kod ljudi, HEV u najvećem broju slučajeva izaziva akutno, samoograničavajuće oboljenje. Infekcije prouzrokovane HEV-om obično protiču bez simptoma (*Sridhar i sar., 2015*), dok se kod određenog procenta slučajeva javlja žutica praćena mučninom, groznicom, bolom u stomaku, povraćanjem i hepatomegalijom. Simptomi se javljaju nakon perioda inkubacije koji traje između 2 i 8 nedelja (*Park i sar., 2016*). Viremija je utvrđena u periodu od oko dve nedelje nakon infekcije i može trajati duže od mesec dana, dok fekalna ekskrecija virusa počinje oko treće nedelje i može trajati različito dug vremenski period (*Aggarwal i sar., 2000*). Zabeležene su takođe različite forme bolesti izazvane ovim uzročnikom. Potvrđeni su slučajevi subkliničkog oblika, ali i perakutnog toka. Samim tim, klinička slika različita je kod različitih oblika. Ipak, ukoliko se simptomi bolesti jave, oni mogu trajati od nekoliko dana do više nedelja (*Purcell i Emerson, 2008*). Smrtni ishodi kod ljudi nisu česti i javljaju se u oko 2% slučajeva (*Park i sar., 2016*). Trudnice predstavljaju najosetljiviju kategoriju i kod njih ishod bolesti može biti fatalan, sa stopom smrtnosti koja iznosi i do 25% (*Aggarwal i Jameel, 2011*).

Kao vid humoralnog odgovor organizma na infekciju prouzrokovanu HEV-om, dolazi do stvaranja i porasta imunoglobulinskih M (IgM) antitela u toku prve nedelje od početka infekcije. IgM antitela mogu se detektovati nekoliko meseci posle prestanka simptoma. Ubrzo nakon stvaranja IgM, počinje sinteza imunoglobulinskih G (IgG) antitela koja se mogu otkriti nekoliko godina posle infekcije (do 23 godine). Obično, 5 godina nakon infekcije, dolazi do opadanja nivoa IgG antitela (*Schemmerer i sar., 2016*).

Jetra i žučni putevi predstavljaju najčešće zahvaćene organe patomorfološkim promenama prilikom infekcija prouzrokovanim HEV-om. Imunološki mehanizmi, kao i kompleks antigen-antitelo najčešći su uzrok patoloških promena na jetri. Osim staze žuči, kod blagih oblika ovog oboljenja nisu zabeležene druge značajnije promene na jetri. Histopatološki nalaz kod ovog oblika pokazuje promene prolaznog karaktera. Ipak, kod određenog broja slučajeva dolazilo je i do značajnih promena na jetri. **Drebber i saradnici** (2013) utvrdili su da kod određenog broja pacijenata dolazi do nekrotičnih promena koje su izazvane ovom infekcijom. Takođe, kod akutnog toka može doći i do akutnog holangitisa, intralobularne nekroze i polimorfne inflamacije.

2.4.2. HEV-a kod domaćih svinja

Nakon što su **Meng i saradnici** 1997. godine otkrili HEV kod svinja, nadovezala su se brojna istraživanja kojima se dokazalo da HEV nije samo rasprostranjen u endemskim područjima, već predstavlja ubikvitarnog uzročnika. Rezultati mnogobrojnih istraživanja pokazali su da izolati poreklom od svinja u najvećem procentu pripadaju genotipu HEV-3a. Ipak, dokazani su i izolati HEV genotipa 4. Ova dva genotipa smatraju se enzootskim za domaće svinje širom sveta (**Okamoto, 2007**). Ispitivani su krvni serumi svinja na prisustvo anti-HEV Ig-M i Ig-G antitela pomoću ELISA testova. Za otkrivanje prisustva RNK virusa iz različitih uzoraka je korišćen klasični PCR (*Polymerase chain reaction*) i PCR u realnom vremenu.

Meng i saradnici 1997. godine, u svojim istraživanjima otkrivaju da na teritoriji SAD postoje farme na kojima 100% odraslih svinja sadrži antitela protiv HEV-a. Analizirajući Evropu, istraživanja u različitim zemljama ukazuju na oscilacije u seroprevalenciji. Sva istraživanja su imala jedan zajednički zaključak, a to je da je potvrđeno prisustvo antitela protiv HEV-a. U Francuskoj je otkriveno da od 186 nasumično odabranih farmi, 65% njih je imalo seropozitivne životinje (**Rose i sar. 2011**). Rezultati su bili još dramatičniji u Norveškoj i Španiji. U Norveškoj je utvrđeno da 90% farmi ima svinje pozitivne na anti-HEV Ig-G (**Lange i sar., 2016**), dok su u Španiji 204 od 208 farmi imale svinje pozitivne na anti-HEV Ig-G (**Casas i sar., 2009**). Na teritorijama Danske i Holandije seroprevalencije na nivou farmi iznosile su oko 55% (**Breum i sar., 2010; Rutjes i sar., 2007**). **Steyer i saradnici** (2011) u svojim istraživanjima prezentuju rezultate po kojima u Sloveniji ona iznosi 33,3%. Prema rezultatima **Asimoula i saradnika** (2009) sve testirane farme na teritoriji severne Grčke imale su svinje pozitivne na anti-HEV antitela.

Seroprevalencija na nivou individualno ispitivanih životinja razlikuje se u odnosu na teritorije koja se obuhvaćene ispitivanjem. Uticaj na heterogenost dobijenih rezultata imale su i različite starosne kategorije životinja koje su ispitivane. Tako su **Meng i saradnici** (1997), tokom svog ispitivanja uočili da infekcija započinje posle 2. meseca života kod prasadi, a da je seroprevalencija znatno veća kod svinja starijih od 4 meseca. **Chandler i saradnici** (1999), kod svinja na teritoriji Australije otkrili su anti-HEV antitela kod 6% kod prasadi stare 9 nedelja, dok je kod prasadi starih 16 nedelja procenat bio značajno veći i iznosio je 95%. **Salines i saradnici** (2017) u svom revijalnom radu izneli su podatke da se seroprevalencija (45 analiziranih istraživanja) kreće od 8 do 93%. Velika restrospektivna studija, u Španiji, za period od 1985. do 1997. godine pokazala je da je među 2871 ispitanih svinja, kod 48,45% zabeleženo prisustvo antitela protiv HEV-a (**Casas i sar., 2009**). U Francuskoj je tokom 2008-2009. godine utvrđeno 31% seropozitivnih jedinki (**Rose i sar., 2011**). **Burri i saradnici** (2014) su tokom petogodišnje studije (2006-2011) došli do saznanja da je u kategoriji svinja mlađih od 1 godine, 58,1% bilo pozitivnih. U Italiji, **Costanzo i saradnici** (2015) su zahvaljujući svojim istraživanjima tokom 2014. godine došli do saznanja da je 80% ispitivanih svinja imalo antitela protiv HEV-a. Na teritoriji Hrvatske, prema podacima **Lipej i saradnika** (2013), 91,7% ispitivanih jedinki je imalo anti-HEV antitela. Ipak, **Jermišić i saradnici** (2017) u svojim istraživanjima dolaze do podataka da je seroprevalencija 32,94%. **Tsachev i saradnici** (2019) objavili su rezultate istraživanja seroprevalencije HEV kod svinja u Bugarskoj, po kojima ukupna prevalencija iznosi 60,3% kao i da varira među regionima i kategorijama ispitivanih svinja. Utvrdili su da je najveća seroprevalencija kod krmača (80%). U Srbiji, na teritoriji Vojvodine, seroprevalencija je bila 34,6%, prema podacima **Lupulović i saradnika** (2010). Takođe, seroprevalencija je oscilirala među različitim opštinama i kretala se u opsegu od 16,7% do 75%.

Potencijalno prisustvo virusne RNK može se ispitati iz različitih vrsta uzoraka poreklom od životinja (serumi, feces, jetra, meso, intestinalni organi) pomoću RT-qPCR (*reverse transcriptase - quantitative polymerase chain reaction*) metode. Ukoliko se prevalencija posmatra na nivou farme,

prema podacima **Salines i saradnika** (2017), a na osnovu rezultata 25 analiziranih istraživanja, utvrđeno je da se prevalencija virusa kreće od 10% do 100%. **Fernández-Barredo i saradnici** (2007) u svom istraživanju u Španiji, tokom 2002 do 2004, dolaze do rezultata da je kod 131 uzorka fecesa i seruma virusna RNK je bila prisutna na 76% farmi. Približno iste rezultate dobili su i istraživači iz Švedske (**Widen i sar.**, 2011), koji su ispitivali uzorke fecesa. Od 240 uzoraka sa 22 farme, 72,7% farmi imalo je najmanje jedan pozitivan uzorak. **Berto i saradnici** (2012) objavili su rezultate u kojima su među ispitivanih 5 farmi iz 5 različitih regiona, sve farme imale pozitivne jedinice. Slične rezultate sa 75% pozitivnih uzoraka fecesa sa 8 farmi, koje su se nalazile na severnom, centralnom i južnom delu Italije objavili su **Monini i saradnici** (2015). U Francuskoj, ispitivanjem uzoraka jetri obuhvaćeno je 186 zapata svinja, a rezultati su pokazali da 24% zapata ima bar po jedan HEV pozitivan uzorak (**Rose i sar.**, 2011). **Reuter i saradnici** (2009) u ispitivanim uzorcima sa 30 farmi u Mađarskoj utvrdili su da je bilo 40% pozitivnih. Potvrda tačnosti ovih rezultata bili su i rezultati (39% pozitivnih) koje su publikovali **Forgach i saradnici** (2010). U Srbiji, **Petrović i saradnici** (2008) objavili su preliminarne rezultate u kojima je infekcija prouzrokovana HEV-om utvrđena na 4 od 5 pregledanih farmi. Ispitivani su uzorci fecesa i tkiva organa svinja različitog porekla.

Ukoliko posmatramo individualnu prevalenciju RNK poreklom iz HEV-a, utvrđene u uzorcima poreklom od svinja, možemo zaključiti da prevalencija veoma osciluje. **Salines i saradnici** (2017), na osnovu rezultata 69 analiziranih istraživanja, došli su do zaključka da se ona može kretati u rasponu od 1% do 89%. U Španiji, **Fernández-Barredo i saradnici** (2007) su dobili rezultate da među 131 ispitivanih uzoraka fecesa i seruma, prevalencija je bila 14% u uzorcima seruma i 16% uzorcima fecesa. U uzorcima poreklom iz fecesa u zemljama Evrope, prevalencija se kretala od 2,5 do 87,5 % (**Hakze-van der Honing i sar.**, 2011; **Steyer i sar.**, 2011; **Widén i sar.**, 2011; **Berto i sar.**, 2012; **Anižić i sar.**, 2014; **Kantala i sar.**, 2015; **Machnowska i sar.**, 2014; **Monini i sar.**, 2015). Kod uzoraka poreklom iz seruma svinja prevalencija se kretala od 0,9% do 44,4% (**Jiménez de Oya i sar.**, 2011; **Thiry i sar.**, 2014; **Crossan i sar.**, 2015; **Grierson i sar.**, 2015; **Ivanova i sar.**, 2015). Analizirajući uzorke jetre u Evropi, prevalencija RNK poreklom iz HEV-a kretala se od 0% do 75% u zavisnosti od zemlje do zemlje (**Rose i sar.**, 2011; **Wenzel i sar.**, 2011; **Berto i sar.**, 2012; **Walachowski i sar.**, 2014; **Jori i sar.**, 2016; **Lainšček i sar.**, 2017; **Feurer i sar.**, 2018). U Srbiji, **Kureljušić** (2012) publikuje rezultate u kojima je RNK poreklom od HEV-a potvrđena kod 5,15% uzoraka rektalnog brisa, dok je od 223 uzorka jetri, RNK dokazana kod 5 uzoraka. RNK poreklom iz HEV-a utvrđena je kod 21,9% krmača u prasilištima (**Fernandez-Barredo i sar.**, 2006). Na osnovu ovih istraživanja postoje mišljenja da i krmače mogu biti izvor HEV-a za prasad.

Pretpostavlja se da je i kod svinja osnovni način prenosa virusa fekalno-oralni put. Ciljni organ ovog virusa je jetra. Ipak, naučnici smatraju da se HEV, pre nego što dođe do jetre, umnožava i u ostalim organima gastrointestinalnog trakta (crevima). Nakon inficiranja, obolele svinje obično su bez vidljivih kliničkih simptoma, mada u nekim slučajevima može doći do blagog, akutnog samoograničavajućeg hepatitisa (**Meng**, 2010). Patohistološkim nalazom utvrđeno je da može doći od blagih do srednjih oblika nekrotičnih promena u pojedinim delovima jetre (najčešće u portalnom delu), sa nakupljenjem mononuklearnih leukocita (**Meng i sar.**, 1997). Inficirane svinje počinju da izlučuju virus preko fecesa jednu do dve nedelje nakon infekcije, dok se širenje nastavlja do dva meseca (**Widen**, 2016). Takođe, uočena je i prolazna viremija. RNK poreklom iz HEV- u uzorcima fecesa i akutna infekcija najčešće je utvrđena kod prasadi starosti od 2 do 4 meseca, dok je kod starijih kategorija daleko niži procenat pozitivnih (**Caruso i sar.**, 2016). Prasad je do do 2. meseca života zaštićena maternalnim antitelima dobijenim putem kolostruma (**Kanai i sar.**, 2010). Odgovor organizma na prisustvo HEV-a ogleda se u stvaranju imunološkog odgovora. IgM antitela predstavljaju antitela koja se prva stvaraju kod obolelih svinja. Ova antitela imaju kratak životni vek, a nakon njih se stvaraju IgG antitela koja su dugoživeća (**Meng i sar.**, 1997). **Krog i saradnici** (2019), došli su do zaključka da je kod prasadi koji potiču od krmača koje su bile HEV seropozitivne, nivo IgG i IgA bio znatno veći. Ova antitela mogla su se detektovati već prvog dana života prasadi (**Kanai i sar.**, 2010). Ova grupa istraživača zaključila je da kod prasadi koja potiču od seropozitivnih krmača,

serokonverzija počinje oko 60-og dana, dok kod onih koja vode poreklo od seronegativnih krmača, ona počinje oko 50-og dana.

Osim fekalno-oralnog puta prenosa, pretpostavlja se da HEV može da se širi među svinjama i preko urina. **Bouwknegt i saradnici** (2009) izneli su mišljenje da se HEV može efikasnije širiti među svinjama preko urina nego putem fecesa.

2.4.3. Prisustvo HEV-a kod divljih svinja i jelenske divljači

Dosadašnja istraživanja sprovedena na teritorijama istočne Azije i Evrope pokazala su da osim domaćih svinja, jelenska divljač i divlje svinje predstavljaju prirodne rezervoare HEV-a. Ove vrste divljih životinja imaju ključnu ulogu u opstanku i daljem širenju ovog virusa (**Okano i sar., 2013; Jemeršić i sar., 2017; Rivero-Juarez i sar., 2018**). Poseban rizik predstavljaju područja koja imaju dugu tradiciju lova i konzumiranja mesa i proizvoda od mesa divljači. Prvi put HEV kod divljači dokazan je u Japanu, a genotipizacijom je utvrđeno da pripada genotipu 3 (**Sonoda i sar., 2004**). Nakon toga, istraživači iz mnogih zemalja Evrope dokazali su prisustvo HEV i potvrdili da ove divlje životinje, kao domaćini, mogu imati značajnu ulogu u prenosu ovog virusa. Tako je HEV kod divljih svinja potvrđen u Španiji, Nemačkoj, Litvaniji i Italiji (**Kukielka i sar., 2015; Anheyer-Behmenburg i sar., 2017; Spancerniene i sar., 2019; Martelli i sar., 2008; De Sabato i sar., 2018; Di Pasquale i sar., 2019; De Sabato i sar., 2019**).

Na osnovu dobijenih rezultata istraživanja, seroprevalencija HEV-a kretala se u rasponu od 4,9% do 57,4%, dok je prevalencija bila do 68,2% (**Pavio i sar., 2017**). Obimno istraživanje sprovedeno u Holandiji ELISA testom ustanovilo je prisustvo anti-HEV antitela kod 12% od 1029 uzoraka krvi divljih svinja i kod 5% od 38 uzoraka krvi jelena, dok kod 8 ispitanih uzoraka poreklom od srneće divljači anti-HEV antitela nisu utvrđena (**Rutjes i sar., 2010**). **Rutjes i saradnici** u istom istraživanju, takođe, navode da je RNK poreklom iz HEV-a otkrivena kod 8% od 106 uzoraka divljih svinja (poreklom iz seruma, fecesa, jetri i mesa), 15% od 39 uzoraka jelena, a da nije utvrđeno prisustvo među 8 ispitanih uzoraka srneće divljači.

U Mađarskoj, **Forgach i saradnici** (2010) objavili su rezultate istraživanja po kome je RNK poreklom iz HEV- prisutna kod 11% ispitanih uzoraka divljih svinja, 22% kod srneće divljači i 10% kod jelenske divljači. **Jemeršić sa saradnicima** (2017) objavila je rad u kome otkrivaju da je ukupna seroprevalencija među divljim svinjama na teritoriji Hrvatske 31,1%, dok je među različitim regionima ona varirala u rasponu od 7,7 do 50,6 %. RNK poreklom iz HEV-a detektovana je kod 11,33% divljih svinja mlađih od godinu dana. Tokom sezona lova u periodu 2013-2015, u Rumuniji je prikupljeno 50 uzoraka poreklom od divljih svinja. Testirani su na prisustvo RNK poreklom od HEV-a i rezultati su pokazali da je 9 uzoraka (18%) bilo pozitivno (**Porea i sar., 2018**). Za razliku od toga, u Sloveniji je seroprevalencija kod 288 ispitivanih seruma iznosila 30,2%, dok je RNK poreklom iz HEV-a otkrivena u samo jednom uzorku (**Žele i sar., 2016**).

2.4.4. Prisustvo HEV-a kod ostalih vrsta životinja

Brzim razvojem tehnologije, razvojem i napretkom novih molekularnih metoda, otkriveno je da HEV može da opstaje, osim kod svinja i jelenske divljači i kod drugih vrsta domaćih i divljih životinja.

HEV je 2001. godine izolovan iz žuči kokoške (**Haqshenas i sar., 2001**). Filogenetskom analizom utvrđeno je da genom kokošijeg virusa ima 60% sličnosti sa izolatima HEV-a poreklom od ljudi (**Marek i sar., 2010**). HEV poreklom od kokošaka svrstani su u posebnu vrstu unutar familije *Hepeviridae*, u *Orthohepevirus B*. Ova vrsta HEV-a karakteristična je samo za ovu vrstu životinja.

HEV kod kokošaka dovodi do „sindroma uvećane jetre i slezine (HS sindrom)”. Karakteriše se povećanom smrtnošću, padom nosivosti, kao i lezijama na jetri (uvećana) i slezini (uvećana).

Postojanje infekcije prouzrokovana HEV-om potvrđeno je i kod konja. **Saad i saradnici** (2007) prezentovali su istraživanje u kom su ispitali 200 uzoraka krvi konja ELISA metodom. Došli su do saznanja da 13% ispitivanih konja ima anti-HEV antitela. Takođe, filogenetskom analizom utvrđeno je da izolati HEV-a poreklom od konja imaju 97-100 % sličnosti sa genomom izolata HEV-a poreklom od ljudi u Egiptu. **García-Bocanegra i saradnici** (2019) navode da je u Španiji RNK poreklom iz HEV-a otkrivena u 0,4% uzoraka seruma konja, 1,2% magaraca i 3,6% kod uzoraka poreklom od mula.

U Kini su 2008. godine **Zhao i saradnici** uspeali su da izoluju novi soj HEV-a u uzorcima poreklom od kunića. Oni su prikupili i ispitali 335 uzoraka seruma sa dve farme i seroprevalencija anti-HEV-nih antitela bila je 57%. Genetička analiza pokazala je da HEV iz uzoraka poreklom od kunića ima sličnost od oko 82% sa sekvencom HEV genotipa 3. Anti-HEV antitela otkrivena su i kod farmskih kunića u SAD, Francuskoj i Holandiji (**Birke i sar., 2014; Izopet i sar., 2012; Burt i sar., 2016**). **Parisi i saradnici** (2019) objavili su rezultate istraživanja koje je za cilj imalo da se ispita prisustvo HEV kod divljih zečeva na teritoriji Italije i Velike Britanije. Došli su do rezultata da je 24,6% uzoraka imalo anti-HEV antitela i 9% uzoraka imalo RNK poreklom iz HEV-a u uzorcima jetre.

Prisustvo infekcije prouzrokovane HEV-om, prvi put u Nemačkoj dokazano je i kod pacova (**Johne i sar., 2010**). Izolati HEV-a poreklom od pacova svrstani su u vrstu *Orthohepevirus B*, a imaju oko 60% sličnosti u nukleotidnim poklapanjima genoma sa izolatima poreklom od ljudi (**Kenney i Meng, 2019**).

Međutim, postoje i životinjske vrste- psi i mačke, kod kojih nije dokazano prisustvo RNK poreklom iz HEV-a, ali je dokazano prisustvo anti-HEV antitela (**McElroy i sar., 2015; Peralta i sar., 2009**).

2.5. Dijagnostičke metode

Nakon što je HEV prvi put izolovan pomoću imuno-elektronske mikroskopije (**Balayan i sar., 1983**), dijagnostičke metode za otkrivanje ovog virusa razvijale su se u dva smera: serološke metode za otkrivanje anti-HEV antitela i molekularne tehnike pomoću kojih se detektovala RNK poreklom iz HEV-a. Iako postoje kulture ćelija koje se korišćene u različitim studijama za rast HEV-a, još uvek ne postoji opšte prihvaćena procedura kultivisanja HEV-a u laboratorijskim uslovima. Najveći problem predstavlja to što se HEV ne replikuje dovoljno efikasno u *in vivo* uslovima. Ipak, sa daljim razvojem tehnologija i novim saznanjima o ovom virusu, samo je pitanje trenutka kada će i ove prepreke biti uspešno prevaziđene.

Serološke metode koje su danas najčešće u upotrebi su imunoenzimski testovi – *ELISA*. Postoji veliki broj komercijalnih i *in-house* testova. Najveće prednosti *ELISA* testova su da su jeftini, veoma brzi i visoko osetljivi. *ELISA* testovi koriste se u istraživačke, ali isto tako i u dijagnostičke svrhe. Pojedina istraživanja različitih komercijalnih *ELISA* testova, pokazala su da se osetljivost kreće u rasponu od 17 do 100 % (**Mast i sar., 1998; Pérez-Gracia i sar., 2016**). O kombinaciji *ELISA* sa *Western blot* metodom postoje oprečna mišljenja u naučnoj zajednici. Jedna grupa naučnika smatra da se ove dve metode mogu dopunjavati, dok drugi smatraju da ove metode daju potpuno iste rezultate. U svakom slučaju, danas ne postoji metoda koja je „zlatni standard” za serološko otkrivanje HEV-a, te su neophodna dalja istraživanja u ovoj oblasti, kojim bi se nastojalo da se ona ustanovi.

Molekularno-biološka dijagnostika HEV-a uključuje više različitih metoda za izolaciju virusa iz određenog uzorka, ekstrakciju njegove RNK i amplifikaciju virusne RNK tehnikom RT-qPCR. Ova tehnika prvi put je postala dostupna krajem 1990-tih (Meng et al., 1998) i bila je specifična za samo jedan genotip izolata HEV-a. Ona i dalje predstavlja jednu od najosetljivijih metoda za otkrivanje prisustva HEV-a u kliničkim uzorcima. Istraživači **Jothikumar i sar.** (2006) razvili su „*One-step TaqMan real-time PCR*“ za detekciju sva četiri HEV genotipa sisara (1-4). Ova metoda omogućava da se i reverzna transkripcija i PCR odvijaju u jednoj tubi, što umanjuje procenat kontaminacije i greške tokom pipetiranja. Prajmeri i probe u ovom testu dizajnirani su na osnovu poređenja 27 sekvenci ORF 3 regiona. EFSA je 2017. godine predložila standardni protokol koji dozvoljava upoređivanje različitih PCR produkata dobijenih upotrebom definisanih protokola za otkrivanje RNK poreklom iz HEV-a. Mreža evropskih referentnih laboratorija za ispitivanje HEV-a (HEVNet, <https://www.rivm.nl/en/hevnet>) definisala je ORF2e-2f region genoma HEV kao deo koji je najmanje podložan mutacijama i kao takav je najidealniji za sekvenciranje i dalju filogenetsku analizu.

Razvoj molekularnih metoda je kontinuiran process, tako da se dalje razvijaju nove molekularno-biološke metode (*Whole genome sequencing, Next generation sequencing*) koje će nam omogućiti sagledavanje kompletnije slike o HEV-u.

2.6. Terapija i imunoprofilaksa kod infekcija prouzrokovanim HEV-om

2.6.1. Terapija infekcija kod ljudi prouzrokovanim HEV-om

Budući da je ovo oboljenje kod ljudi uglavnom samoograničavajuće, uglavnom se ne primenjuje specifična terapija lečenja pacijenata koji su oboleli od infekcija prouzrokovanim HEV-om, dok je kod težih oblika bolesti moguća primena potporne terapije. Takođe, kod određenih kategorija ljudi (imunokompromitovane osobe) preporučuje se terapija lekovima koji deluju protiv virusa (interferon, ribavirin). Fokus sprovođenja kontrole i prevalencije HEV-a nije na terapiji, već na sprovođenju adekvatnih sanitarnih mera, profilaksi i u novije vreme primeni vakcine (**Mushawar, 2008**).

2.6.2. Vakcine protiv HEV

Purcell i Emerson (2008) u svom istraživanju iznose mišljenje da, obzirom da sva 4 najčešće otkrivena genotipa HEV-a pripadaju istom serotipu, HEV može biti dobar kandidat za razvijanje vakcine. Ipak, do sada je jedino u Kini registrovana vakcina (HEV 239). Na kineskom tržištu je dostupna i dozvoljena za upotrebu je pod nazivom *Hecolin* (**Wu i sar., 2016**). Svetska zdravstvena organizacija izdala je mišljenje u kom smatra da se ova vakcina može koristiti kao deo profilakse u posebnim situacijama (epidemije, putovanja, trudnice) u endemskim područjima (**WHO, 2015**). Veliko, otvoreno polje za istraživanje je i vakcinacija životinja, a pre svega svinja ovim vakcinama. Postoje određene grupe istraživača koje se bave ovom temom, pogotovo u Kini, ali još uvek nema dovoljno rezultata koji bi doveli do opštih zaključivanja. **Liu i saradnici** (2014) u svojim istraživanjima uspeali su da imunizuju zečeve HEV 239 vakcinom. Zečevi su imali visok titar anti-HEV antitela i nisu imali znake infekcije prouzrokovane HEV-om (inficirani genotipom 4 i 7 HEV). Prevažodni cilj budućih istraživanja trebalo bi da bude usmeravanje ka smanjenju rizika od zoonotskih infekcija prouzrokovanim HEV-om, primenom vakcinacije svinja (**Liu i sar., 2014**).

2.6.3. Profilaksa

U zemljama koje predstavljaju endemska područja za HEV-1 i HEV-2, najvažnija mera prevencije je poboljšanje sanitarnih uslova kao i obezbeđivanje vode adekvatnog kvaliteta. Edukacija lokalnog stanovništva, podizanje nivoa sveopšteg znanja o ovoj temi takođe je veoma značajna. Putnicima koji se usmeravaju ka endemskim područjima trebalo bi preporučiti da konzumiraju vodu poznatog porekla, kao i da obrate pažnju na primenu osnovnih higijenskih mera.

Jednu od najvažnijih, ako ne i najvažniju kariku u prevenciji HEV-a kroz lanac hrane predstavlja dobra profilaksa na nivou farmi. Problem kod ovog oboljenja predstavlja klinička slika obolelih jedinki. Svinje obolele od infekcije prouzrokovane HEV-om uglavnom ne pokazuju simptome bolesti i ovakve svinje šalju se u klanicu, a zatim meso i proizvodi od ovakvih životinja ulaze u lanac hrane kao „bezbedni”. Idealni scenario bio bi uspostavljanje farmi sa statusom HEV negativni. Ukoliko nije moguće postići ovaj nivo, onda treba težiti ka cilju da se smanji broj obolelih svinja, pogotovo pri samom završetku tova. Odgovarajući sistem vođenja farmi, visok nivo biosigurnosnih mera i higijene (adekvatna dezinfekcija boksova i opreme) na farmi predstavljaju neke od važnih mera koje je moguće sprovesti na ovom nivou (**Rose i Pavo, 2014**). Jedna od mera kojima se može smanjiti prisustvo HEV-a na farmama je i obezbeđenje adekvatne opreme za radnike na farmi i posetioce. **Wilhelm i saradnici** (2016) u svojim istraživanjima došli su do rezultata da se prevalencija ovog virusa na farmama smanjivala kada su posetioци nosili čizme i imali obavezno tuširanje pre ulaska u objekte sa svinjama. Takođe, ovi istraživači smatraju da na farmama koje obavljaju završni tov, prevalencija HEV-a raste ukoliko svinje potiču sa više različitih farmi. **Salines i saradnici** (2019) objavili su rezultate istraživanja po kojima držanje krmača u manjim grupama, kao i prasadi nakon zalučanja dovodi do smanjenog prisustva HEV-a. Ova grupa naučnika zaključila je da i vakcinacija svinja protiv imunomodulatornih virusa ima pozitivan efekat na prevalenciju HEV-a. Ipak, neophodna su dalja ispitivanja u ovom polju. Nova istraživanja bi nam pružila dodatne informacije kojima ćemo preciznije definisati uslove koji bi kao rezultat imali efikasno smanjenje prevalencije HEV-a na nivou farmi.

U razvijenim zemljama gde osnovni izvor infekcija prouzrokovanim HEV-om predstavlja hrana (jetra, meso, kao i proizvodi u čiji sastav ulazi jetreno tkivo), najbitnije je sprovesti dobru higijensku praksu kroz ceo lanac hrane. U klanici je neophodno poštovati sve higijenske procedure kojima se onemogućava unakrsna kontaminacija i prenošenje HEV-a preko opreme. Takođe, neophodno je adekvatno skladištenje i manipulacija sa mesom i organima svinja kako bi se eventualno sprečilo dalje širenje virusa. Jedna od najvažnijih karika ovog lanca jeste odgovarajuća toplotna obrada mesa, jetri i proizvoda. Prema nekim istraživačima, opšte preporuke za zagrevanje hrane (70°C/2 min) možda nisu dovoljno efikasne za potpunu inaktivaciju HEV-a (**Johne i sar., 2016**). Ukoliko je virus prisutan u tkivu ili u nekom drugom matriksu, on pokazuje još veći stepen otpornosti na tretmane zagrevanja (**Ricci i sar., 2017**). Ovo potvrđuju i rezultati koje su dobili istraživači na čelu sa Barnaud (**Barnaud i sar., 2012**). U svom istraživanju došli su do otkrića da termička obrada jetrene pašete koje sadrži HEV tokom 10 min na 71°C nije u potpunosti inaktivisala virus. Za razliku od toga, 20 minuta bilo je dovoljno za potpunu inaktivaciju.

Neophodno je pružiti adekvatne informacije stanovništvu o ovom virusu, mogućim izvorima oboljenja kao i merama koje se mogu sprovesti u cilju prevencije. Svakako, akcenat treba staviti na imunokompromitovane grupe, a to se posebno odnosi na trudnice.

3. CILJEVI ISTRAŽIVANJA

Kako u dostupnoj literaturi još uvek postoji relativno mali broj podataka o virusima koji se prenose hranom u našoj zemlji, posebno o samom HEV-u, kao i njegovom prisustvu kod svinja za klanje, čije su meso i proizvodi od mesa najzastupljeniji na našem tržištu, cilj ove doktorske disertacije je da se primenom molekularno-bioloških tehnika izvrši otkrivanje prisustva, identifikacija i genotipizacija HEV-a u jetrama svinja na klanici i u maloprodaji na teritoriji Republike Srbije. Takođe bi se ispitali i brisevi sa radnih površina i opreme u klanicama, radi utvrđivanja eventualne transmisije virusa preko klanične opreme. Kod pozitivnih uzoraka, planirano je da se ustanovi opterećenost tkiva jetre ovim virusom, a daljom filogenetskom analizom utvrdi genetička povezanost između naših potvrđenih sekvenci HEV-a i onih ranije opisanih u svetu.

Dodatni cilj bio je da se optimizuje metodologija za izolaciju HEV-a, ekstrakcija RNK i RT-qPCR tehnika potvrđivanja, kako bi se snizio limit detekcije i omogućilo smanjenje procenta lažno negativnih uzoraka.

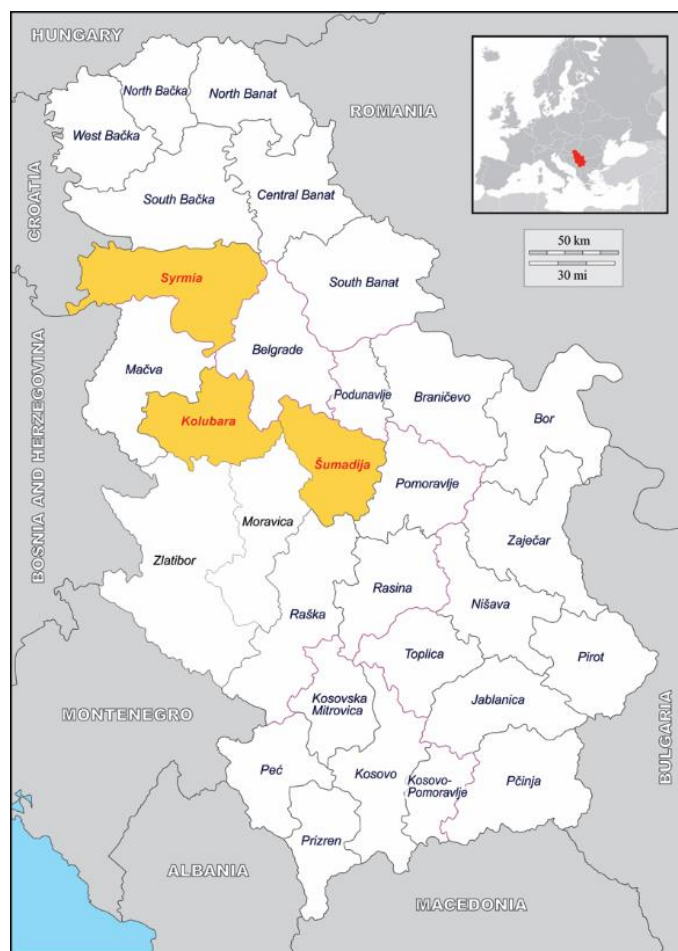
Za ostvarenje ciljeva navedenih u okviru doktorske disertacije, postavljeni su sledeći zadaci:

- Prikupiti uzorke jetri i briseva površina i opreme u kontaktu sa hranom u toku jedne godine sa teritorije 3 okruga u Srbiji (Srem, Kolubara i Šumadija), na kvartalnom nivou (tromesečni interval), prema unapred definisanom planu;
- Uraditi ekstrakciju virusne RNK optimizovanom metodologijom, zahvaljujući kojoj bi prinos RNK u pozitivnim uzorcima bio značajno veći i čime bi bio smanjen procenat lažno negativnih rezultata;
- Metodom RT-qPCR ispitati prisustvo HEV u pripremljenim uzorcima RNK poreklom od jetri i briseva površina u kontaktu sa hranom;
- Definisati regiju i veličinu oligonukleotidnog fragmenta koji će predstavljati matricu za amplifikaciju i sekvencioniranje;
- Na osnovu redosleda nukleotida dobijenih sekvenciranjem, filogenetskom analizom ispitati genetičku povezanost između referentnih sekvenci sa našim, potvrđenim sekvencama;
- Kod HEV pozitivnih uzoraka, ustanoviti opterećenost tkiva jetre ovim virusom;
- Sistematizovati, statistički obraditi i uraditi uporednu analizu dobijenih rezultata.

4. MATERIJAL I METODE

4.1. Prikupljanje i čuvanje uzoraka

U cilju ispitivanja prisustva HEV-a kod svinja na klanicama Republike Srbije, uzorci jetri i briseva površina i opreme u kontaktu sa hranom prikupljeni su iz tri registrovane klanice koje se nalaze u tri različita okruga (Srem, Kolubara i Šumadija) naše zemlje. Sva tri okruga okružuju Beograd (slika 4) i predstavljaju važne izvore svinjskog mesa i proizvoda od svinjskog mesa za grad u kome živi veliki broj stanovnika, gde potrošači, između ostalog, na tržištu zahtevaju zdravstvenu bezbednost proizvoda kojeg konzumiraju.



Slika 4. Mapa Srbije podeljene po okruzima, žutom bojom označeni su okruzi u kojima se ispitivalo prisustvo HEV-a
Milojević i saradnici (2019)

Uzorci su prikupljeni tokom godinu dana, a ceo period podeljen je na četiri kvartala (sezone). Prvim kvartalom obuhvaćeni su meseci januar, februar i mart- zimska sezona. Drugi su činili april, maj i jun – prolećna sezona, dok su pod treći kvartal potpali jul, avgust i septembar- letnja sezona. Poslednji, četvrti kvartal, koji je predstavljao jesenju sezonu, obuhvatao je oktobar, novembar i decembar.

Prikupljeni uzorci jetre pripadali su jedinkama koje su nakon veterinarsko sanitarnog *ante* i *postmortem* pregleda procenjene kao klinički zdrave i upućene na klanje, a čije su meso i parenhimatozni organi procenjeni kao higijenski upotrebljivim za javnu potrošnju.

Stratifikacija uzoraka urađena je prema starosnom uzrastu svinja, a izabrane su one klanice u kojima se, nakon veterinarsko sanitarnog pregleda, obavljalo klanje mlađih (do 3 meseca) i starijih kategorija svinja (preko 6 meseci). Pored toga, stratifikacija je izvršena i na osnovu pola životinja. Iz svakog okruga, u svakom kvartalu, prikupljeno je po 50 uzoraka jetri svinja mlađe kategorije, po 25 uzoraka jetri svinja starije kategorije i po 5 briseva površina i opreme u klanici koje su dolazile u kontakt sa jetrama svinja tokom rada. Istovremeno, prikupljeni su i uzorci jetri iz maloprodajnih objekata sa teritorije pomenuta tri okruga, tako što je svakog kvartala prikupljeno po 15 uzoraka jetri.

Tkivo za analizu uzorkovano je iz režnja jetre (*lobus hepaticus dexter medialis*) na kome se nalazila žučna kesa i koja je odstranjena pre uzorkovanja. Postupak uzorkovanja urađen je u aseptičnim uslovima korišćenjem sterilnih rukavica i noževa. Uzorkovano je $30 \text{ g} \pm 10 \text{ g}$ jetrenog tkiva za svaki uzorak. Uzorci su stavljani u 50 mL Falkon tube i dopremljeni u laboratoriju u ručnim frižiderima u hladnom lancu, pri temperaturi od $4 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$.

Brisevi su, neposredno pre uzimanja uzoraka sa površina i opreme, ovlaženi sa specifičnim medijumom (Dulbecco Modified Eagle Medium) proizvođača Sigma-Aldrich, Nemačka. Uzorkovanje briseva sa površina u proizvodnom pogonu urađeno je prema ISO 18593:2018-*Mikrobiologija lanca hrane - Horizontalne metode za tehnike uzimanja uzoraka sa površine*.

Uzorci jetri iz maloprodaje prikupljeni su na teritorijama sva tri okruga nezavisno od ostalih uzoraka. Postupci uzorkovanja i transporta uzoraka bili su identični kao kod uzoraka jetri iz klanica.

U laboratoriji, svi uzorci čuvani su pri temperaturi od -20°C do početka rada.

4.2. Razvoj i optimizacija metode za ekstrakciju i otkrivanje virusne RNK

4.2.1. Ekstrakcija virusne RNK

Zamrznuti uzorci svinjskih jetri ostavljeni su pri sobnoj temperaturi tokom 30 minuta da bi se odledili pre daljeg rada. Pomoću sterilnih makaza i pincete od svakog uzorka jetre odvojen je deo tkiva, mase oko 100 mg i prenesen u posebnu epruvetu od 2 mL (Sarstedt, Nemačka). Nakon toga, u svaki uzorak dodato je po 10 μL Mengo virusa (vMCO) koji je predstavljao kontrolni materijal za praćenje efikasnosti ekstrakcije RNK. U svaku epruvetu pipetirano je po 1 mL Trizola (Invitrogen, USA) i po 600 μg cirkonijumskih kuglica dijametra 0,1 mm.

Uzorci su, zatim, homogenizovani u homogenizatoru BeadBeater (Biospec, USA), a potom centrifugirani na $12.000 \times g$ tokom 10 minuta pri temperaturi od 4°C (Eppendorf, Nemačka). Dobijeni supernatant prebačen je u nove epruvete koje su u sebi sadržale PLG (phase lock gel) proizvođača 5 Prime, Nemačka.

U sledećoj fazi dodato je 200 μL hloroforma i nakon inkubacije od 5 minuta, uzorci su ponovo centrifugirani na $12.000 \times g$ tokom 10 minuta pri 4°C . Nakon centrifugiranja gornja, vodena faza supernatanta, pažljivo je otpipetirana u nove epruvetice od 2 mL i čuvana pri -70°C do početka postupka izolacije RNK.

Postupak izolacije virusa iz briseva uzetih sa površina iz klanica počinjao je vorteksovanjem briseva u trajanju od 30 s. Suspenzija iz briseva zatim je bila prebačena u nove epruvete od 2 mL i potom centrifugirana na $2.500 \times g$ tokom 15 min na 4°C . Dobijeni supernatant prebačen je u nove epruvete koje su u sebi sadržale PLG i dalji tok ekstrakcije virusa iz briseva pratio je postupak ekstrakcije virusa iz uzoraka jetre.

4.2.2. Izolacija virusne RNK

Izolacija virusne RNK izvedena je korišćenjem komercijalnog kompleta za ekstrakciju RNeasy Mini Kit (Qiagen, Nemačka) prema laboratorijski optimizovanom protokolu. Početni materijal za izolaciju virusne RNK predstavljao je supernatant koji je prethodno dobijen postupkom ekstrakcije virusa i čuvan pri -70°C .

Zapremina svakog pojedinačnog uzorka bila je $400 \mu\text{L}$. Potom je u iste epruvete dodata jednaka zapremina radnog rastvora RTL pufera iz kompleta, $10 \mu\text{L}$ β -merkaptetanola, a zatim ista zapremina 70% etanola. Negativna i pozitivna kontrola takođe su bile deo postupka izolacije RNK. U epruveti koja je predstavljala negativnu kontrolu, dodato je $400 \mu\text{L}$ vode, dok je u epruvetu koja je predstavljala pozitivnu kontrolu dodato $400 \mu\text{L}$ supernatanta jetre koja je prethodno bila sigurno dokazana kao pozitivna na prisustvo HEV genotipa 3a.

Uzorci su vorteksovani tokom 30 s, a zatim je otpipetirano po $700 \mu\text{L}$ u RNeasy kolone. RNeasy kolone zatim su centrifugirane na $8.000 \times g$ tokom 15 s. Dobijeni eluat (flow-through) je odbačen. Isti postupak ponovljen je sa preostalom zapreminom uzoraka. Zatim su u RNeasy kolone dodata dva različita pufera pomoću kojih se vršilo ispiranje i prečišćavanje RNK. Prvi pufer dodat je u zapremini od $700 \mu\text{L}$, a uzorci su potom centrifugirani na $8.000 \times g$ tokom 15 s, nakon čega je odbačen eluat. Drugi pufer dodat je u zapremini od $500 \mu\text{L}$ centrifugiran na $8.000 \times g$ tokom 15 s, dok je eluat ponovo odbačen. Postupak sa drugim puferom ponovljen je još jednom, s tim da je centrifugiranje na $8.000 \times g$ trajalo 2 minuta. Produženo vreme centrifugiranja imalo je za cilj da se maksimalno eluira pufer i u što većoj meri smanji rezidualna zapremina tečnosti na RNeasy kolonama. U RNeasy kolone dodato je po $40 \mu\text{L}$ „RNA-se free“ vode (Ambion, USA) i one su potom centrifugirane na $8.000 \times g$ tokom 1 minuta. Postupak je ponovljen još jednom, pri čemu je zapremina vode koja je naknadno dodata iznosila $30 \mu\text{L}$. Dobijeni supernatant prebačen je u nove epruvete od $1,5 \text{ mL}$ i čuvan pri -70°C do izvođenja RT-qPCR reakcije.

4.2.3. Otkrivanje RNK poreklom od HEV-a primenom RT-qPCR metode

Uzorci i kontrole dalje su podvrgnuti procesima reverzne transkripcije i lančane reakcije polimerazom u jednom koraku, a rezultati ovog postupka mogli su se pratiti u realnom vremenu RT-qPCR. Za ovaj proces korišćen je komercijalni komplet „UltraSense One-step Quantitative RT-qPCR System” (Life Technologies, USA). Prajmeri HEV3-f i HEV3-r, kao i HEV3 proba predstavljaju deo sekvenci u preklapajućem ORF2/3 regionu genoma HEV-a (*Jothikumar i sar., 2006*).

U cilju optimizacije metode otkrivanja RNK iz HEV-3, delimično je izmenjen forward prajmer. Naime, BLAST analizom javno dostupnih sekvenci virusa HEV-3 (National Center for Biotechnology Information, NCBI database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), kod određenog broja izolata, utvrđena je SNV (single nucleotide variant) mutacija na poziciji 5323 (referenca GenBank pristupni broj AF060669) u zoni preklapanja ORF2/3 kod koje je adenin (A) zamenjen guaninom (G). Kako bismo smanjili broj lažno negativnih RT-qPCR amplifikacija (posledično i uzoraka) nastalih usled ove mutacije, u forward prajmer uveden je degenerisani nukleotid „R” (A+G).

HEV3-r prajmer i HEV3 proba nisu modifikovane. TaqMan proba obeležena je na krajevima sa fluorescentnom bojom FAM/BHQ1 (Microsynth, Švajcarska).

Tabela 2. Prajmeri i Taqman proba korišćeni u molekularnoj identifikaciji RNK HEV-a

| Naziv prajmera | Sekvenca (5'-3') | Referenca |
|----------------|-------------------------|-------------------------|
| JVHEVF (fw) | GGT GGT TTC TGG RGT GAC | Jothikumar i sar., 2006 |
| JVHEVR (rev) | AGG GGT TGG TTG GAT GAA | Jothikumar i sar., 2006 |
| JVHEVP (proba) | TGA TTC TCA GCC CTT CGC | Jothikumar i sar., 2006 |

fw- forward prajmer; rev- reverse prajmer

RT-qPCR reakcija za svaki uzorak i kontrole urađena je u zapremini od 25 μ L (20 μ L reakcione smeše i 5 μ L uzorka). Reakciona smeša sastojala se od po 5 μ L 5 \times reakcionog pufera (RNA UltraSense One-Step Quantitative RT-PCR System, Invitrogen, USA), 1,25 μ L smeše enzima, 0,5 μ M forward prajmera, 0,9 μ M reverse prajmera, 0,25 μ M probe i PCR čiste vode do zapremine od 20 μ L.

Reakcije su izvođene na optičkim mikro pločama od 96 bunarčića (Agilent, SAD) na RealTime PCR aparatu AriaMX (Agilent, USA). Reverzna transkripcija i amplifikacija RNK urađena je prema sledećim vremenskim i temperaturnim režimima:

- Reverzna transkripcija pri 55° C u trajanju od 60 minuta;
- Inicijalna aktivacija enzima na 95° C tokom 5 minuta i
- 45 ciklusa [1 ciklus sastoji se od: denaturacije (95° C, 15 s), hibridizacije prajmera i proba (60° C, 60 s) i elongacije (65° C, 60 s].

Pomoću kompjuterskog softvera proizvođača uređaja i specifičnih dijagrama za preračunavanje nivoa fluorescencije omogućena je vizuelizacija dobijenih pozitivnih segmenata genoma. Pozitivni rezultati manifestovali su se pojavom eksponencijalne krive, što je predstavljalo rezultat umnožavanja ispitivanog PCR produkta (segmenta genoma) u svakom ciklusu. Sa rastom broja PCR produkata, dolazilo je i do rasta eksponencijalne krive. Budući da u negativnoj kontroli i negativnim uzorcima nije bilo prisustva ispitivanog PCR produkta, rast eksponencijalne krive izotao je u tim uzorcima.

Mengo virus, koji je korišćen kao procesni materijal za kontrolu efikasnosti ekstrakcije RNK (optimizaciju metode), nepatogen je virus koji pripada familiji *Picornaviride*, a poseduje osobine koje su slične HEV virusu. U samoj reakciji upotrebljena je specifična TaqMan reakciona smeša za vMC0, zapremine od 20 μ L u koju je dodavano po 5 μ L ekstrakta nukleinske kiseline Mengovirusa, prema standardu ISO 15216-2:2019: Microbiology of the food chain — Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus using real-time RT-PCR — Part 2: Method for detection.

4.3. Sekvenciranje dela genoma HEV-a

Za potrebe karakterizacije i genotipizacije dobijenih izolata virusa hepatitisa E je izvršeno sekvenciranje dela genoma virusa u oblasti ORF2 (ORF2e+ORF2f).

U prvom koraku virusna RNK prepisana je procesom reverzne transkripcije (RT) u komplementarnu DNK, budući da RNK ne može da se koristi kao matrica za PCR, jer Taq polimeraza kao matricu koristi isključivo jednolančani molekul DNK. Za proces reverzne transkripcije korišćen je komercijalni kit SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) sa nasumičnim heksamerima. Sastavi reakcionih smeša i temperaturni protokoli prikazani su u tabelama 3-5.

Tabela 3. Sastav I reakcione smeše

| Komponenta | Zapremina po uzorku |
|--|---------------------|
| Ukupna RNK virusa hepatitisa E | 5 μ L |
| Nasumični heksameri (random hexamers) 50 ng/ μ L | 1 μ L |
| dNTP mix 10 mM | 1 μ L |
| Voda (RNA-se free water) | 3 μ L |

Navedena reakciona smeša inkubirana je pri 65°C tokom 5 minuta, a zatim ohlađena na ledu tokom 2 minuta. Potom je pripremljena II reakciona smeša, navedena u tabeli 4.

Tabela 4. Sastav II reakcione smeše

| Komponenta | Zapremina po uzorku |
|---|---------------------|
| 10 \times RT buffer | 2 μ L |
| 25 mM MgCl ₂ | 4 μ L |
| 0.1 M DTT | 2 μ L |
| RNaseOUT (40 U/ μ L) | 1 μ L |
| SuperScript III reverzna transkriptaza (200 U/ μ L) | 1 μ L |

Po 10 μ L reakcione smeše I i II zajedno je pomešano u ependorf tubicama od 200 μ L i inkubirano prema temperaturnom protokolu opisanom u tabeli 5.

Tabela 5. Temperaturni protokol za sintezu komplementarne DNK

| Vreme | Temperatura |
|--------|-------------|
| 10 min | 25°C |
| 50 min | 50°C |
| 5 min | 85°C |

Zatim je iz dobijene komplementarne DNK virusa hepatitisa E amplifikovan fragment DNK koji je umnožen pomoću forvard prajmera (GAGGAGGAAGCTACCTC) i reverse prajmera (GGAGAAGGAGTTGGTCG), kao i korišćenjem Amplitaq 360 MasterMix kita (Applied Biosystems, USA), a sastav reakcione smeše naveden je u tabeli 6. Proces amplifikacije izvodio se pod sledećim uslovima: 2 minuta pri 50°C (dekontaminacija), 5 minuta pri 95°C (inicijalna denaturacija), a zatim 40 ciklusa od 30 sekundi pri 95°C, 20 sekundi pri 60°C i 15 sekundi pri 72°C. Amplifikacija virusne DNK izvršena je na aparatu AB2720 (Applied Biosystems, USA).

Tabela 6. Sastav reakcione smeše za amplifikaciju fragmenta virusa hepatitisa E

| Komponenta | Zapremina po uzorku |
|---------------------------------|---------------------|
| Amplitaq Gold 360 MasterMix | 12,5 µL |
| Forward prajmer 10 µM | 1 µL |
| Reverse prajmer 10 µM | 1 µL |
| Voda (RNA-se free water) | 5,5 µL |
| Uzorak cDNK virusa hepatitisa E | 5 µL |
| UKUPNA ZAPREMINA | 25 µL |

U cilju kontrole odvijanja procesa amplifikacije, kao i kontrole kontaminacije, uz uzorak je pripremana pozitivna kontrola (HEV pozitivni uzorak, Genbank acc. no. MG051653) i negativna kontrola (NT, eng. no template). Proizvodi PCR reakcije analizirani su elektroforezom u 1,5% agaroznom gelu (Thermo Fisher Scientific, USA), pri 100 V tokom 60 minuta.

Nakon dobijanja pozitivnog rezultata na agaroznom gelu (produkata očekivane veličine), u cilju sekvenciranja izvršeno je prečišćavanje PCR produkata upotrebom komercijalnog kompleta QIAquick DNA purification kit (Qiagen, Nemačka) prema uputstvu proizvođača. Upotrebom ovog kita, prečišćavanje PCR produkata odvijalo se u ultrafiltracionim spin kolonama. U prvom koraku vršila se apsorpcija umnožene DNK za površinu silicijumske membrane u prisustvu pufera (pH < 7,5) i visoke koncentracije soli. Tokom faze adsorpcije prajmeri i ostale nečistoće (nevezani nukleotidi, agarozna, SYBR Green boja, deterdženti i soli) prolazili su kroz kolonu, ne vezujući se za silicijumsku membranu. Rezidue soli ispirale su se puferom PE, koji sadrži etanol. Višak PE pufera uklanjao se centrifugiranjem. Elucija DNK izvršena je EB puferom (10 mM Tris-Cl, pH 8,5). Kvalitet prečišćenih fragmenata proveravan je na 1,5 % agaroznom gelu. Koncentracija i čistoća eluata određivana je merenjem apsorbance na spektrofotometru (Eppendorf, Nemačka) pri 260 nm i 280 nm. Sekvenciranje je izvedeno korišćenjem dual chain Sanger sequencing kapilarne tehnike na aparatu 3730xl DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA) u kompaniji Microsynth AG u Švajcarskoj.

4.4. Određivanje filogenetske srodnosti

Za potrebe ovog istraživanja, 56 uzoraka, koji su bili pozitivno identifikovani na prisustvo virusa hepatitisa E, a u cilju genotipizacije, kao i detaljnije molekularne analize, pripremljeni su za sekvenciranje. Uzorci su sekvencirani celom dužinom amplikona metodom po Sangeru korišćenjem GenomeLab Dye Terminator Cycle Sequencing (DTCS) kita (Beckman Coulter, USA) i automatskog DNK sekvencera (Beckman Coulter, USA) u laboratoriji Microsynth, Švajcarska. Za sekvenciranje su upotrebljeni isti prajmeri, koji su korišćeni i za proces amplifikacije.

Eksperimentalno dobijene nukleotidne sekvence analizirane su u cilju provere kvaliteta sekvenciranja. Sekvence su proverene u oba pravca pomoću on-line programa Clustal Omega, a istim programom izvršeno je upoređivanje (engl. alignment) dobijenih sekvenci. Ovako obrađena kompletna sekvenca je u cilju identifikacije dalje analizirana upotrebom BLAST programa (engl. Basic Local Alignment Search Tool), a konsenzus sekvence su upoređene sa sekvencama odgovarajućeg ORF2 regiona genoma virusa hepatitisa E dostupnim u „GenBank“ - bazi podataka (National Center for Biotechnology Information, NCBI database, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Filogenetska analiza u prvom koraku obuhvatala je poravnavanje skupova sekvenci, sa ciljem da broj neuparenih mesta u ispitivanim sekvencama bude što manji, primenom CLUSTAL W algoritma u okviru online programa PAUP (Phylogenetic Analysis Using PAUP). Algoritam

maksimalne verovatnoće (engl. Maximum likelihood) i algoritam pridruživanja taksona (engl. Neighbor joining) u programu MEGA X (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) upotrebljeni su za procenu evolutivne srodnosti sekvenci, određivanje njihove evolutivne udaljenosti i konstrukciju filogenetskih stabala (Kumar i sar., 2018). Butstrep analiza (engl. Bootstrap) je urađena u većem broju ponavljanja (1000) u cilju provere stabilnosti i izračunavanja statističke podrške topologiji stabla. Za određivanje matrice nukleotidne udaljenosti korišćen je Kimura dvoparametarski model sa odnosom tranzicija/transverzija od 2.0. Bootstrap vrednosti > 70 smatrane su signifikantnim.

U cilju definisanja filogenetskih odnosa ispitivanih izolata virusa hepatitisa E iz Srbije u odnosu na izolate ovih virusa iz Evrope i ostalih geografskih područja u svetu, u istraživanju su korišćene sekvence navedene u NCBI (engl. National Center for Biotechnology Information) bazi podataka. Sekvence korišćene u filogenetskoj analizi za potrebe ovog istraživanja prikazane su u tabeli 7.

Tabela 7. Sekvence virusa hepatitisa E korišćene u filogenetskoj analizi preuzete iz GenBank baze podataka

| Broj | Vrsta virusa | Genotip | Podtip genotipa | GenBank accession no |
|------|--------------|---------|-----------------|----------------------|
| 1. | HEV | G3 | 3a | AB074918 |
| 2. | HEV | G3 | 3a | AB074920 |
| 3. | HEV | G3 | 3a | AB089824 |
| 4. | HEV | G3 | 3b | AB091394 |
| 5. | HEV | G3 | 3b | AB189070 |
| 6. | HEV | G3 | 3b | AB222182 |
| 7. | HEV | G3 | 3b | AB222184 |
| 8. | HEV | G3 | 3b | AB236320 |
| 9. | HEV | G3 | 3b | AB246676 |
| 10. | HEV | G3 | 3e | AB248520 |
| 11. | HEV | G3 | 3e | AB248521 |
| 12. | HEV | G3 | 3k_p | AB290312 |
| 13. | HEV | G3 | 3m_p | AB290313 |
| 14. | HEV | G3 | 3f | AB291961 |
| 15. | HEV | G3 | 3b | AB291963 |
| 16. | HEV | G3 | 3f | AB369687 |
| 17. | HEV | G3 | 3n_p | AB369689 |
| 18. | HEV | G3 | 3a | AB481228 |
| 19. | HEV | G3 | 3b | AB630971 |
| 20. | HEV | G3 | 3n_p | AB740232 |
| 21. | HEV | G3 | 3a | AF082843 |
| 22. | HEV | G3 | 3g | AF455784 |
| 23. | HEV | G3 | 3b | AP003430 |
| 24. | HEV | G3 | 3j | AY115488 |
| 25. | HEV | G3 | 3l_p | EU360977 |
| 26. | HEV | G3 | 3f | EU375463 |
| 27. | HEV | G3 | 3f | EU495148 |
| 28. | HEV | G3 | 3f | EU723516 |

| Broj | Vrsta virusa | Genotip | Podtip genotipa | GenBank accession no |
|------|--------------|---------|-----------------|----------------------|
| 29. | HEV | G3 | 3a | FJ426403 |
| 30. | HEV | G3 | 3a | FJ426404 |
| 31. | HEV | G3 | 3b | FJ527832 |
| 32. | HEV | G3 | 3f | FJ653660 |
| 33. | HEV | G3 | 3c | FJ705359 |
| 34. | HEV | G3 | 3f | FJ956757 |
| 35. | HEV | G3 | 3i | FJ998008 |
| 36. | HEV | G3 | 3e | FJ998015 |
| 37. | HEV | G3 | 3a | HQ389543 |
| 38. | HEV | G3 | 3a | JN837481 |
| 39. | HEV | G3 | 3f | JN906974 |
| 40. | HEV | G3 | 3h | JQ013794 |
| 41. | HEV | G3 | 3o_p | JQ953664 |
| 42. | HEV | G3 | 3e | JQ953665 |
| 43. | HEV | G3 | 3f | JQ953666 |
| 44. | HEV | G3 | 3c | KC618402 |
| 45. | HEV | G3 | 3a | KJ507955 |
| 46. | HEV | G3 | 3q_p | KP294371 |
| 47. | HEV | G3 | 3l_p | KT581446 |
| 48. | HEV | G3 | 3l_p | KT581447 |
| 49. | HEV | G3 | 3r_p | KU176130 |
| 50. | HEV | G3 | 3s_p | KY780957 |

Sve dobijene sekvence deponovane su u Genbank-u i dodeljeni su im pristupni brojevi (postupak u toku).

4.5. Kvantifikacija HEV-a poreklom iz jetri

Za određivanje broja kopija virusa u jetrenom tkivu, konstruisan je sintetički molekul (RNK transkript). Komplementarna DNK virusa hepatitisa E (Genbank acc. no. MG051653) veličine 71 nukleotid klonirana u pEXA2 vektor (Eurofins, Nemačka) i klonirana u bakteriji *E. coli* One Shot aTOP10F (Invitrogen, USA). Korišćenjem Plasmid Midi kit-a (Qiagen, Nemačka) prečišćena je plazmidska DNK, koja je potom digestirana HindIII enzimom (NEB, Canada), a dobijeni fragmenti su *in vitro* transkribovani pomoću MEGAscript kit-a (Ambion, USA) prema uputstvu proizvođača. Sintetisana RNK potom je tretirana DNA-se I enzimom radi eliminacije rezidualne plazmidske DNK, a zatim prečišćena pomenutim kitom RNeasy Mini kit (Qiagen, Nemačka). Sintetisana RNK kvantifikovana je merenjem apsorbance pri 260 i 280 nm pomoću aparata NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) i formule $GC = \frac{\text{masa (g)} \times 6,023 \times 10^{23}}{[\text{dužina (bp)} \times 320,5]}$. RNK je pipetirana u volumenima od po 50 μL , pri čemu je broj GC iznosio 10^9 gc/ μL . Uzorci su do početka rada čuvani pri temperaturi od - 80°C.

Prilikom određivanja broja kopija virusa napravljena su decimalna razređenja sintetičke RNK, koja su u duplikatu ispitivana na RT-qPCR aparatu zajedno sa pozitivnim uzorcima. NA osnovu dobijenih Ct vrednosti duplikata razređenja standarda, u softveru Microsoft Excel 2019 konstruisana

je regresiona kriva, na osnovu koje je jednostavnom ekstrapolacijom utvrđen broj kopija virusa u tkivu.

4.6. Statistička obrada dobijenih rezultata ispitivanja

Za poređenje broja pozitivnih i negativnih uzoraka korišćen je Hi-kvadrat (χ^2) ili Fišerov egzaktni test.

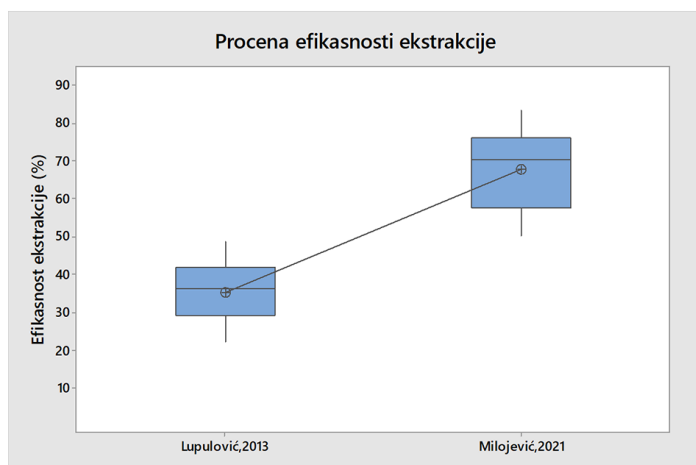
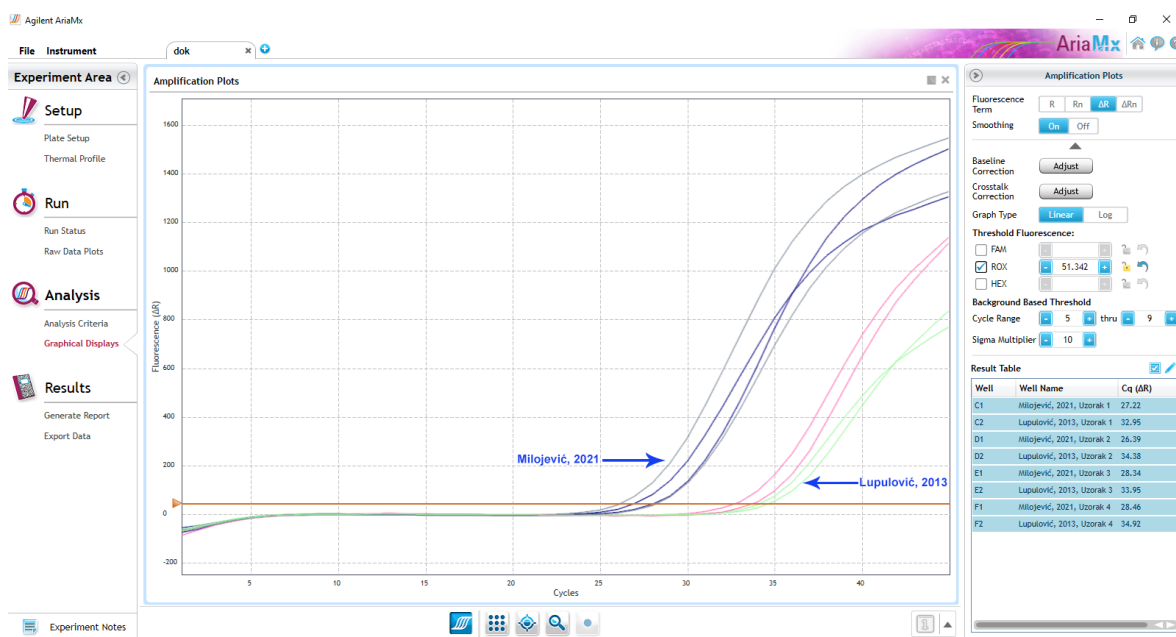
Normalna raspodela podataka o broju genomskih kopija po gramu uzorka testirana je koristeći Shapiro - Wilk test normalnosti. Budući da uzorci nisu normalno distribuirani (Shapiro - Wilk test, $p < 0,05$), za poređenje grupa je korišćena Kruskal-Valisova analiza varijanse (Kruskal-Wallis analysis of variance). U slučaju kada je postojala statistički signifikantna razlika između grupa, parovi grupa međusobno su poređeni putem Dunn's testa.

Statistička analiza izvedenog eksperimenta urađena je u statističkom paketu GraphPad Prism verzija 6.00 za Windows, (GraphPad Software, San Diego, California, USA) www.graphpad.com i aplikaciji MS Excel.

5. REZULTATI ISTRAŽIVANJA

5.1. Razvoj i optimizacija metode za ekstrakciju i otkrivanje virusne RNK

Budući da ne postoji standardna metoda za molekularno-biološko otkrivanje HEV, u okviru izrade ove doktorske disertacije razvijena je i optimizovana metodologija za efikasnu ekstrakciju i pouzdano otkrivanje RNK poreklom iz virusa hepatitisa E. Optimizacija metode rezultovala je povećanjem volumena intracelularnog sadržaja hepatocita usled mehaničke destrukcije membrana, inhibicijom tkivnih RNA-za (delovanjem Trizola i β -merkaptotetanol), povećanjem čistoće ekstrakta RNK (višestrukim uklanjanjem RT-qPCR inhibitora i totalnom separacijom RNA od kontaminirajućih proteina i DNA).



| | N | Mean | StDev | SE Mean |
|-----------|----|-------|-------|---------|
| Lupulović | 12 | 35,23 | 8,30 | 2,4 |
| Milojević | 12 | 67,6 | 10,2 | 2,9 |

Difference = μ (Lupulović) - μ (Milojević)
 Estimate for difference: -32,40
 95% CI for difference: (-40,27; -24,52)
 T-Test of difference = 0 (vs \neq): T-Value = -8,53
 P-Value = 0,000 DF = 22
 Both use Pooled StDev = 9,2984

Slika 5. Grafički prikaz rezultata ispitivanja efikasnosti ekstrakcije

Za procenu efikasnosti metode iz ove disertacije, korišćena je komparacija sa metodom koju je opisala **Lupulović, 2013**. Kao kriterijum za procenu korišćen je procenat efikasnosti ekstrakcije (EE) eksterne procesne kontrole (Mengovirus - vMC0). Limit prihvatljivosti metode iznosio je $EE \geq 3\%$. Na slici 5. prikazani su rezultati procene efikasnosti metode.

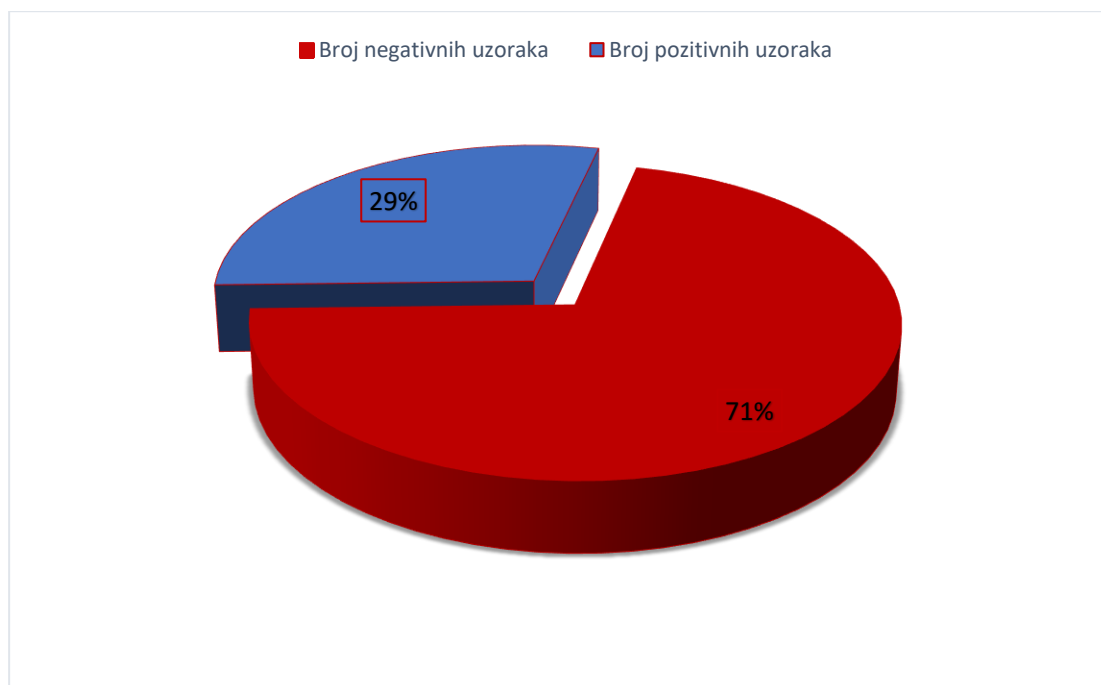
Efikasnost ekstrakcije metode razvijene u ovoj disertaciji iznosila je $67,6 \pm 10,2\%$, dok je EE metode po **Lupulović**, 2013 iznosila $35,23 \pm 8,30\%$. Statističkom obradom utvrđeno je da se javila statistički značajna razlika ($p < 0,001$) između ispitivanih metoda ekstrakcije virusne RNK.

5.2. Prisustvo i zastupljenost HEV-a

5.2.1. Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a uzoraka jetri svinja na klanicama

Od ukupno 900 testiranih uzoraka jetri svinja poreklom iz klanica, prisustvo HEV-a utvrđeno je kod 261 (29%), dok kod 639 (71%) uzoraka nije utvrđeno prisustvo ovog virusa (Grafikon 1).

Analizom dobijenih rezultata od ukupno 960 ispitanih uzoraka jetri, prosečna vrednost efikasnosti ekstrakcije iznosila je $67,60 \pm 10,2\%$.



Grafikon 1. Procentualna zastupljenost HEV-a kod testiranih uzoraka jetri od svinja zaklanih u klanicama

Prema starosnoj kategoriji životinja od kojih su poticali, uzorci su sistematizovani u dve grupe: mlađi od 3 meseca i stariji od 6 meseci (Tabela 8). Pored toga, uzorci su sistematizovani i prema godišnjim dobima i okruzima iz kojih potiču.

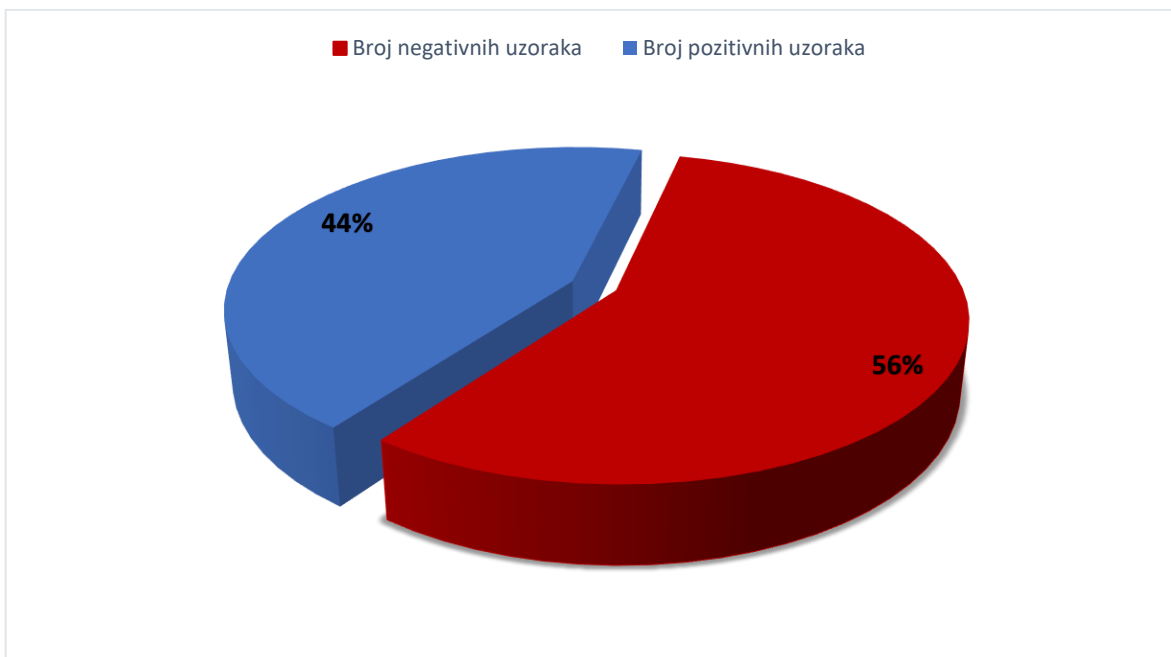
Tabela 8. Tabelarni prikaz rezultata ispitivanih uzoraka sistematizovanih na osnovu okruga, porekla, kategorija i sezona iz kojih potiču

| Sezona | Okrug | Uzorci jetri od svinja mlađih od 3 meseca | | | Uzorci jetri od svinja starijih od 6 meseca | | | Brisevi sa površina | Uzorci iz maloprodaja |
|---------|----------|---|--------|---------|---|-------|--------|---------------------|-----------------------|
| | | 50/3 | 25/0* | 25/3** | 25/0 | 13/0* | 12/0** | | |
| Zima | Šumadija | 50/3 | 25/0* | 25/3** | 25/0 | 13/0* | 12/0** | 5/0 | 15/2 |
| | Kolubara | 50/35 | 25/20* | 25/15** | 25/0 | 11/0* | 14/0** | 5/0 | |
| | Srem | 50/36 | 24/17* | 26/19** | 25/0 | 13/0* | 12/0** | 5/3 | |
| Proleće | Šumadija | 50/6 | 27/3* | 23/3** | 25/0 | 12/0* | 13/0** | 5/0 | 15/1 |
| | Kolubara | 50/4 | 20/0* | 30/4** | 25/0 | 14/0* | 11/0** | 5/0 | |
| | Srem | 50/41 | 25/24* | 25/17** | 25/0 | 13/0* | 12/0** | 5/5 | |
| Leto | Šumadija | 50/0 | 30/0* | 20/0** | 25/0 | 13/0* | 12/0** | 5/0 | 15/0 |
| | Kolubara | 50/44 | 27/23* | 23/21** | 25/0 | 12/0* | 13/0** | 5/3 | |
| | Srem | 50/40 | 25/21* | 25/19** | 25/0 | 12/0* | 13/0** | 5/1 | |
| Jesen | Šumadija | 50/5 | 23/2* | 27/3** | 25/0 | 13/0* | 12/0** | 5/0 | 15/0 |
| | Kolubara | 50/17 | 23/4* | 27/13** | 25/0 | 12/0* | 13/0** | 5/0 | |
| | Srem | 50/30 | 22/16* | 28/14** | 25/0 | 14/0* | 11/0** | 5/1 | |

Legenda:

1. Broj uzoraka / broj pozitivnih
- 2.* - Muški pol
- 3.** - Ženski pol

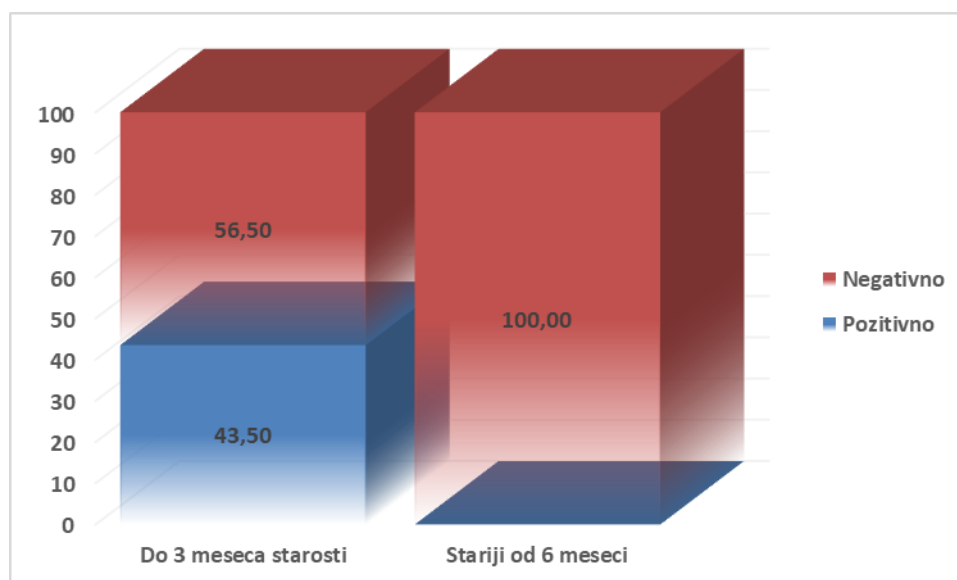
Dobijeni rezultati ispitivanih uzoraka jetri od životinja starijih od 6 meseci pokazali su da kod ove starosne kategorije HEV nije bio prisutan. Nasuprot tome, među ispitanim uzorcima jetri poreklom od prasadi (do 3 meseca starosti), HEV utvrđen je kod 261 (44%), dok je negativnih uzoraka bilo 339 (56% [Grafikon 2]).



Grafikon 2. Procentualna zastupljenost HEV-a kod testiranih uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca

5.2.2. Analiza distribucije HEV-a prema starosnim kategorijama svinja

Statističkom analizom uzoraka jetri sa linije klanja ispitivan je procenat pozitivnih uzoraka u odnosu na starosne kategorije. Od ukupnog broja (600) ispitivanih uzoraka starosti mlađe od tri meseca utvrđeno je 261 (43,50%) pozitivnih i nešto više od 55% (339) negativnih uzoraka. Analizirajući starosnu kategoriju stariji od 6 meseci, gde je ukupno bilo 300 uzoraka, ni jedan uzorak nije bio pozitivan na prisutvo HEV-a. Statistički značajne razlike javile su se između ispitivanih starosnih kategorija (< 3 i >6 meseci) $p < 0,001$.



Grafikon 3. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja na osnovu starosne kategorije

Tabela 9. Analiza varijabilnosti prisustva HEV-a prema starosti

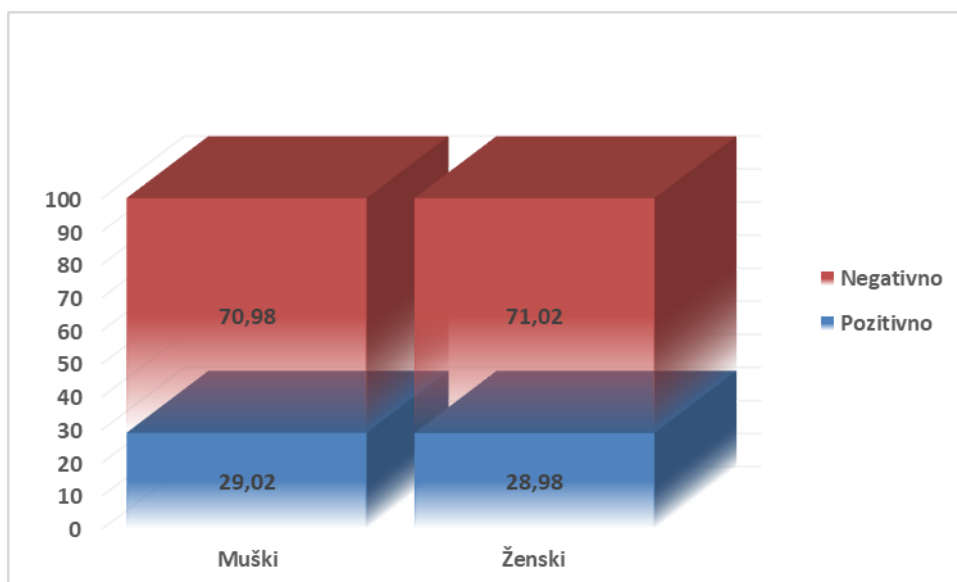
| Starosna kategorija | Stariji od 6 meseci |
|--------------------------|---------------------|
| Mlađi od 3 meseca | <0,001*** |

Legenda:

1. *** < 0,001

5.2.3. Analiza distribucije HEV-a na osnovu polova

Na osnovu rezultata obrađenih uzoraka prema polu (muški/ženski), statističkom analizom ustanovljeno je da od ukupnog broja uzoraka od jedinki muškog pola (448), 130 (29,02%) bilo je pozitivno, dok je preostalih 318 (70,98%) bilo negativno. Analizirajući ženski pol, od ukupnog 452 uzorka, pozitivno na HEV-a bilo je 131 (28,98%), a negativno 321 (71,02%). Daljom analizom podataka utvrđeno je da između polova nije bilo velikih varijacije, samim tim nisu ni ustanovljene statistički značajne razlike.



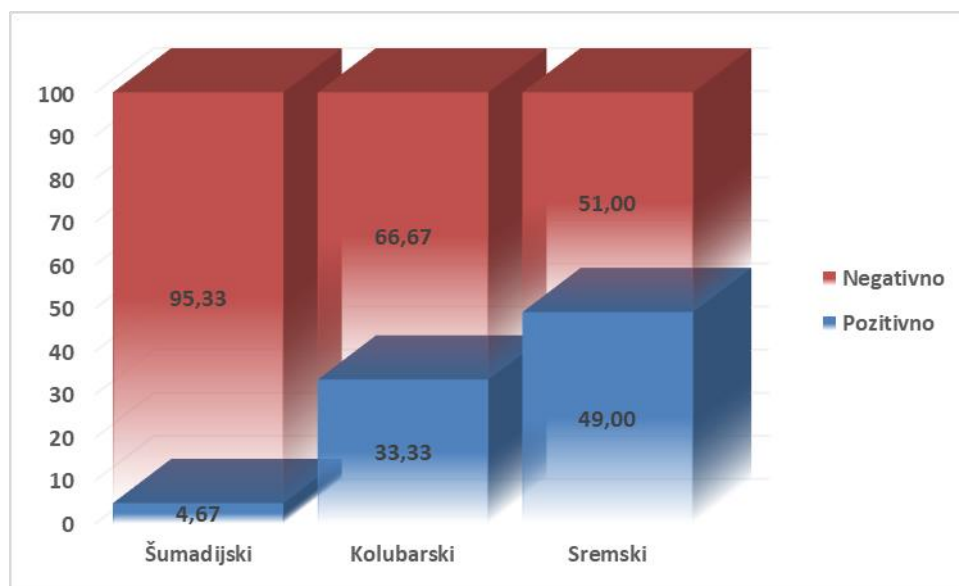
Grafikon 4. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja na osnovu pola

Tabela 10. Analiza varijabilnosti prisustva HEV-a u odnosu na pol

| Pol | Ženski |
|--------------|--------|
| Muški | >0,999 |

5.2.4. Analiza teritorijalne distribucije HEV-a

Dalja statistička analiza 900 obrađenih uzoraka sa linije klanja urađena je na osnovu teritorijalne distribucije (tri okruga). Šumadijski okrug je region gde je bilo utvrđeno 14 (4,67%) pozitivnih uzoraka, dok je 286 (95,33%) bilo negativno. U Kolubarskom bilo je 100 (33,33%) pozitivnih uzoraka, a 200 (66,67%) uzoraka bilo je negativno na prisustvo HEV-a. Treći okrug koji je bio obuhvaćen istraživanjem bio je Sremski i u njemu je ustanovljeno 147 (49,00%) pozitivnih od 300 ispitanih uzoraka. Statističkom analizom, između sva tri okruga Republike Srbije mogu se ustanoviti statistički značajne razlike. Signifikantne razlike $p < 0,001$ javile su se između svih ispitivanih okruga. Najveći procenat pozitivnih uzoraka zabeležen je u Sremskom okrugu, dok je najmanje broj pozitivnih uzoraka utvrđen u Šumadijskom okrugu.



Grafikon 5. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja grupisani prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

Tabela 11. Analiza geografske varijabilnosti prisustva HEV-a

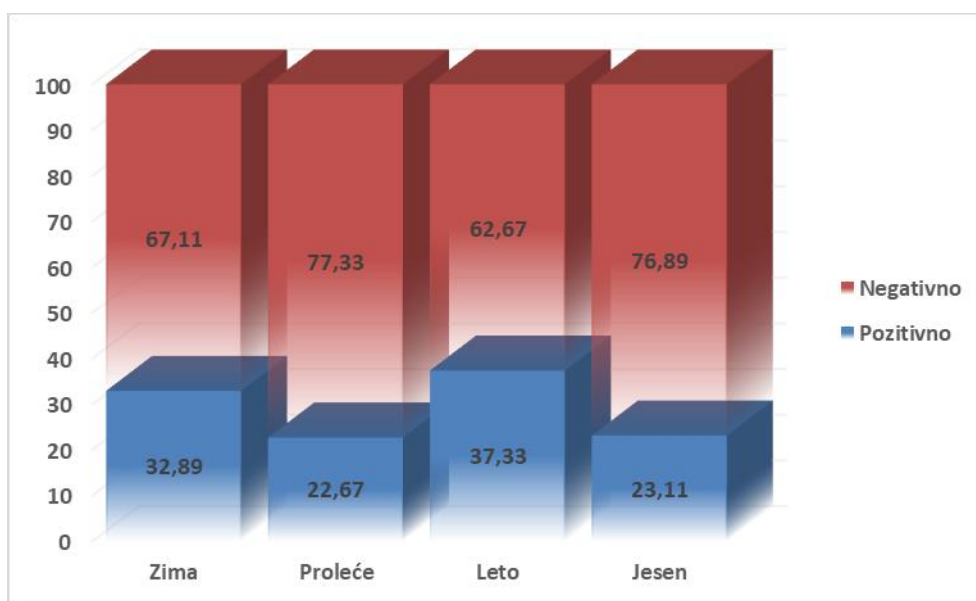
| Okrug | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|-----------|
| Šumadijski | <0,001*** | <0,001*** |
| Kolubarski | | <0,001*** |

Legenda:

1. *** < 0,001

5.2.5. Analiza sezonske distribucije HEV-a

Sistematizacijom uzoraka prema sezoni (godišnjem dobu) i analizom sa adekvatnim statističkim paketima, pokušali smo da ustanovimo mogućnost periodične - sezonske pojave virusa. Analizirajući rezultate prisutvo HEV-a po sezonama, kod uzoraka jetri sa linije klanja, ustanovljene su signifikantne razlike između većine ispitivanih sezona. Statistički značajne razlike javile su se između zime/proleća i zime/jeseni $p < 0,05$, dok su između sezona proleće/leto i leto/jesen iznosile $p < 0,001$. Veći procenat pozitivnih uzoraka zabeležen je u sezonama zime i leta, dok je tokom proleća i jeseni zabeležen značajno manji procenat pozitivnih uzoraka. U zimskom periodu, od ukupnog broja ispitivanih uzoraka (225), utvrđena su 74 (32,89%) pozitivna uzorka, dok je 151 (67,11%) bilo negativno. Tokom proleća, bilo je 51 pozitivnih (22,67%) i 174 (77,33%) negativnih uzoraka. Nasuprot tome, tokom leta, ustanovljeno je prisustvo virusa kod 84 (37,33%) ispitanih uzoraka. Na jesen je bilo utvrđeno 52 (23,11%) pozitivna i 173 (76,89%) negativna uzorka.



Grafikon 6. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja u odnosu na godišnja doba

Tabela 12. Analiza sezonske varijabilnosti prisustva HEV-a

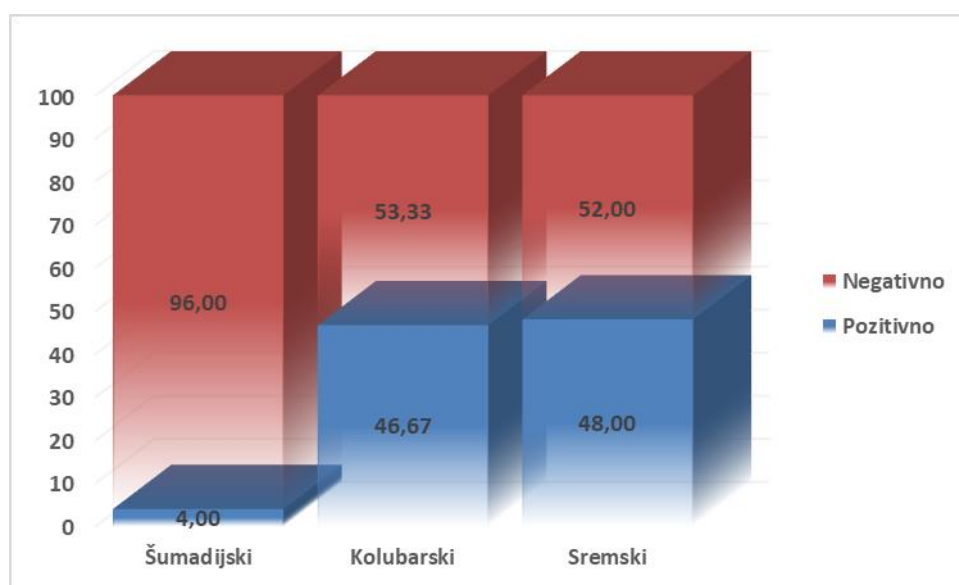
| Godišnje doba | Proleće | Leto | Jesen |
|---------------|---------|-----------|---------|
| Zima | 0,020* | 0,374 | 0,027* |
| Proleće | | <0,001*** | >0,999 |
| Leto | | | 0,001** |

Legenda:

1. * < 0,5
2. ** < 0,01
3. *** < 0,001

5.2.6. Analiza teritorijalne distribucije HEV-a po sezonama

Ispitivanje uzoraka na prisutvo HEV-a u jetri sa linije klanja vršilo se i sezonski, na osnovu okruga. Tokom zime ispitivana su tri okruga (Šumadijski, Kolubarski i Sremski). Kod sva tri okruga ispitivan je isti broj uzoraka (75). Statističkom analizom, u Šumadijskom okrugu je od ukupno ispitivanih uzoraka, prisustvo HEV-a ustanovljeno kod 4% uzoraka, dok je negativno bilo 96%. Nasuprot tome, kod Kolubarskog okruga 35 (46,67%) uzoraka bilo je pozitivno, a 40 (53,33%) negativno na prisustvo virusa. U Sremskom okrugu, obradom dobijenih rezultata utvrđeno je da su 36 (48,00%) pozitivna i 39 (52,00) negativna uzorka. Analizirajući okruge tokom zimske sezone, ustanovljena je signifikantna razlika $p < 0,001$ između Šumadijskog i Kolubarskog, kao i između Šumadijskog i Sremskog okruga.



Grafikon 7. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja u zimskom kvartalu prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

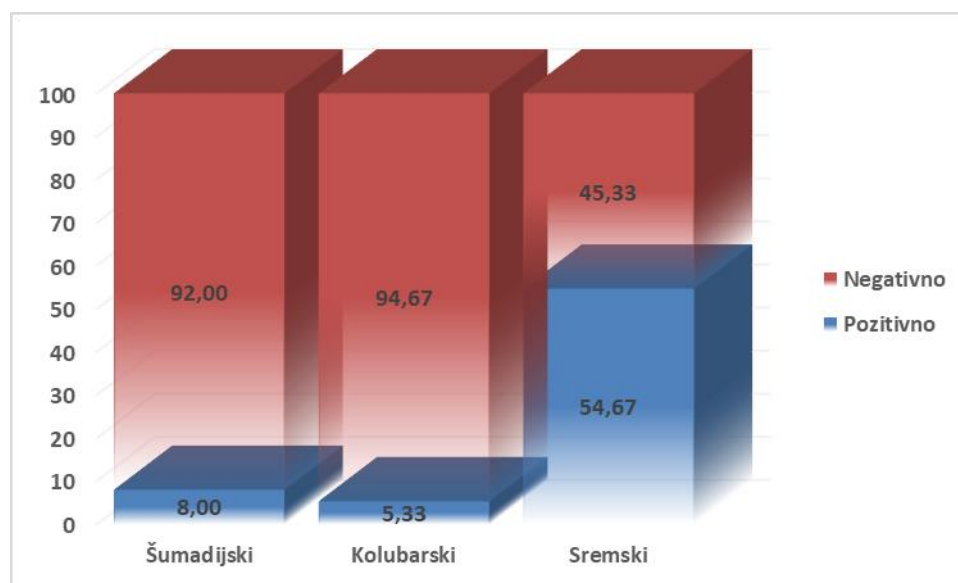
Tabela 13. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisustva HEV-a tokom zime

| Zima | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|-----------|
| Šumadijski | <0,001*** | <0,001*** |
| Kolubarski | | >0,999 |

Legenda:

1. *** < 0,001

Uzorkovanje jetri sa linije klanja, kao i ispitivanje prisutva HEV-a nastavilo se i na proleće. Statističkom analizom, u Šumadijskom okrugu, od ukupnog broja ispitivanih uzoraka ustanovljeno je prisustvo HEV-a kod 6 (8,00%) uzoraka, dok je negativno bilo 69 (92,00%). Dalje, u Kolubarskom okrugu 4 uzorka (5,33%) bilo je pozitivno, a 71 (94,67%) negativno na prisustvo ovog virusa. U Sremskom okrugu ustanovljeno je da su 41 uzorka (54,67%) pozitivna i 34 (45,33%) negativna. Analizirajući okruge tokom proleća, ustanovljena je signifikantna razlika između Šumadijskog i Sremskog, kao i Kolubarskog i Sremskog okruga $p < 0,001$. Tokom proleća, u Šumadijskom i Kolubarskom okrugu utvrđena je niska prevalencija HEV-a, dok je u Sremskom okrugu prisustvo ovog virusa bilo značajno učestalije.



Grafikon 8. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja u prolećnom kvartalu prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

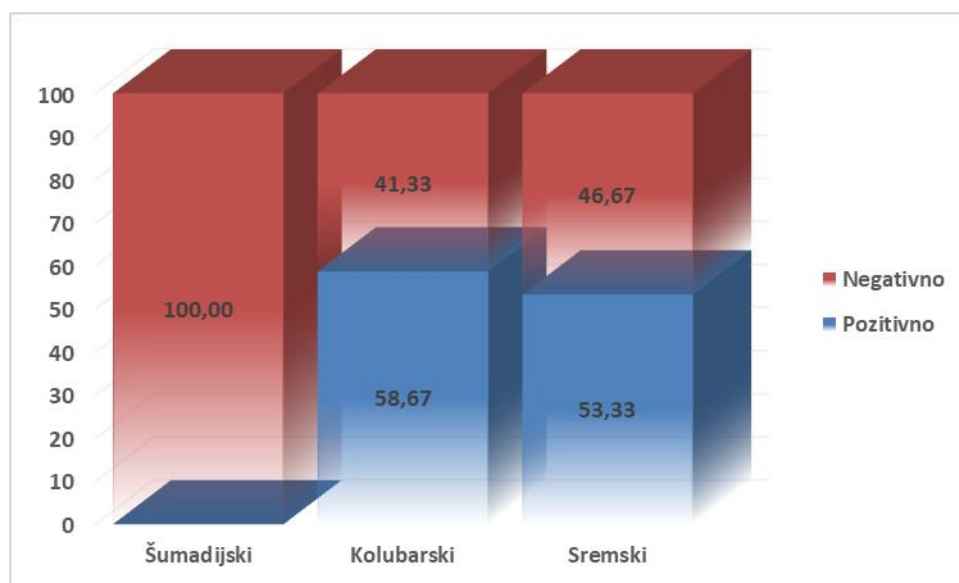
Tabela 14. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisutva HEV-a tokom proleća

| Proleće | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|-----------|
| Šumadijski | 0,745 | <0,001*** |
| Kolubarski | | <0,001*** |

Legenda:

1. *** < 0,001

Ispitivanja uzoraka jetri dalje su nastavljena i tokom letnje sezone. Ona su se i dalje vršila sa teritoriji tri okruga, sa istim brojem uzoraka (75) po okrugu. U Šumadijskom okrugu tokom ove sezone nije ustanovljeno prisustvo HEV-a. Nasuprot tome, kod Kolubarskog okruga 44 uzorka (58,67%) bilo je pozitivno, a 31 (41,33%) negativno na prisustvo ovog virusa. U Sremskom okrugu, analiza dobijenih rezultata pokazala je da je 40 (53,33%) uzoraka bilo pozitivno, a 35 (46,67%) negativno. Analizirajući okruge tokom letnje sezone, ustanovljena je značajna razlika $p < 0,001$ između Šumadijskog i Kolubarskog, kao i između Šumadijskog i Sremskog. Šumadijski okrug je i tokom letnje sezone imao značajno nižu prevalenciju u odnosu na preostala dva okruga u kojima se procenat pozitivnih kretao iznad 50%.



Grafikon 9. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja u letnjem kvartalu prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

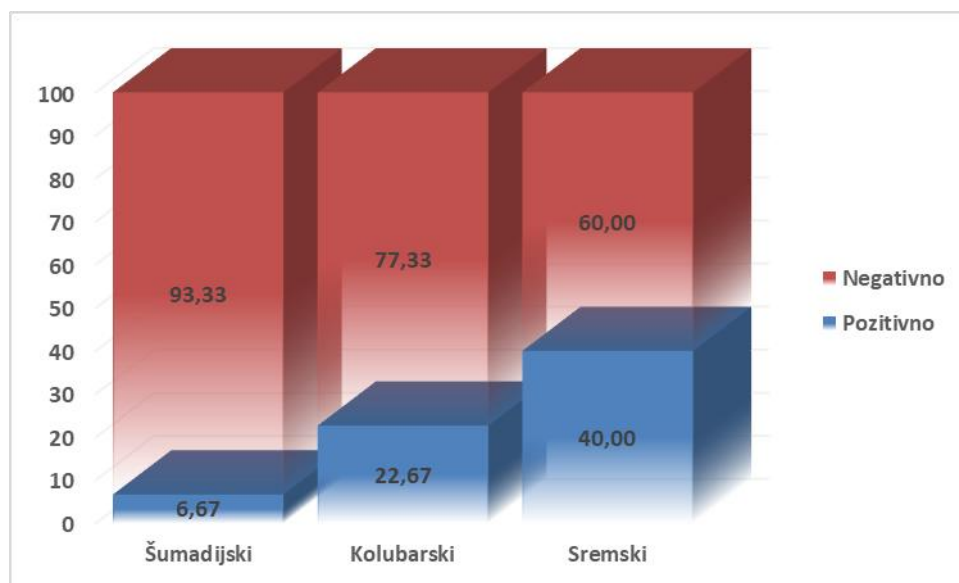
Tabela 15. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisustva HEV-a tokom leta

| Leto | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|-----------|
| Šumadijski | <0,01*** | <0,001*** |
| Kolubarski | | 0,622 |

Legenda:

1. *** < 0,001

Četvrta sezona u kojoj su vršena ispitivanja bila je jesen. Kao i u prethodnim sezonama, kod sva tri okruga ispitivan je isti broj uzoraka (75). Tokom jeseni, u Šumadijskom okrugu ustanovljeno je prisustvo HEV-a kod 6,67% uzoraka, dok je 93,33% bilo negativno na isti virus. Nasuprot tome, kod Kolubarskog okruga 17 uzoraka (22,67%) bilo je pozitivno, a 58 (77,33%) negativno na prisustvo ovog virusa. U trećem ispitivanom (Sremskom) okrugu, utvrđeno je 30 (40,00%) uzoraka koji su bili pozitivni i 45 (60,00%) negativnih. Analizirajući prevalenciju HEV-a tokom jeseni, a prema okruzima, ustanovljena je statistički značajna razlika između svih ispitivanih okruga (Šumadijski/Sremski $p < 0,001$, Šumadijski/Kolubarski $p < 0,01$ i Kolubarski/Sremski $p < 0,05$).



Grafikon 10. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja u jesenjem kvartalu prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

Tabela 16. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisustva HEV-a tokom jeseni

| Jesen | Kolubarski | Sremski |
|-------------------|------------|-----------|
| Šumadijski | 0,010** | <0,001*** |
| Kolubarski | | 0,034* |

Legenda:

1. * < 0,5
2. ** < 0,01
3. *** < 0,001

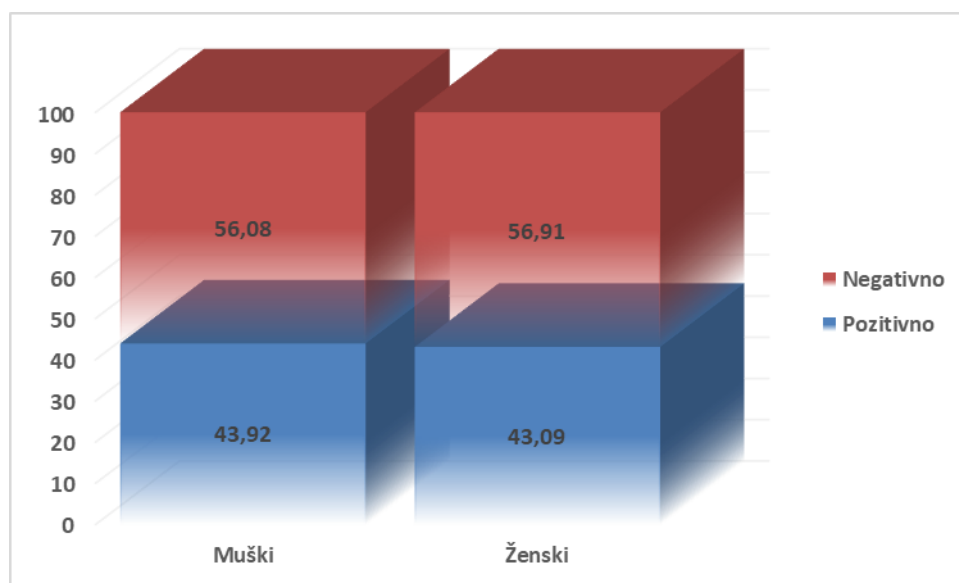
Analizom dobijenih rezultata tokom četiri sezone, a na osnovu teritorijalne distribucije, možemo zaključiti da je u Šumadijskom okrugu prevalencija HEV-a bila najniža. U sve četiri sezone procenat pozitivnih kretao se od 0% do 8% i bio je značajno manji u odnosu na Sremski i Kolubarski (osim proleća). Sremski okrug je tokom celokupnog istraživanja bio okrug sa najvišim procentom pozitivnih uzoraka. Prevalencija se u ovom okrugu, tokom sezona kretala u intervalu od 40% do 54,67%. Kolubarski okrug bio je region u kom su zabeležene najveće varijacije u prevalenciji među sezonama. Najmanji procenat pozitivnih zabeležen je tokom prolećne sezone (5,3%). Nasuprot tome, tokom preostale tri sezone zabeležen je značajno veći procenat pozitivnih uzoraka. Letnja sezona bila je period u kom je ustanovljen najveći procenat pozitivnih uzoraka (58,67%).

5.2.7. Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica

Budući da su utvrđeni pozitivni uzorci jetri od svinja sa linije klanja bili poreklom od svinja mlađih od 3 meseca, posebno je statistički obuhvaćena i analizirana ova grupa uzoraka. Daljom obradom podataka obuhvaćeno je 600 uzoraka odgovarajuće starosne kategorije. Dobijeni rezultati pokazali su da osim prevalencije, kod pojedinih analiza utvrđene su i razlike u nivoima značajnosti.

5.2.7.1. Analiza distribucije HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica prema polovima

Statističkom analizom uzoraka na osnovu polova, može se doći do zaključka da je od ukupnog broja 296 uzoraka jetri od jedinki muškog pola, pozitivnih na virus bilo 130 (43,92%), dok je 166 (56,08%) bilo negativno. Pri analiziranju 304 uzoraka jetri poreklom od jedinki ženskog pola, pozitivno na prisustvo HEV bilo je 131 (43,09%), dok je ostatak uzoraka 173 (56,91%) negativno. Kada je analizirana statistička značajnosti između polova, signifikante razlike nisu se javile.



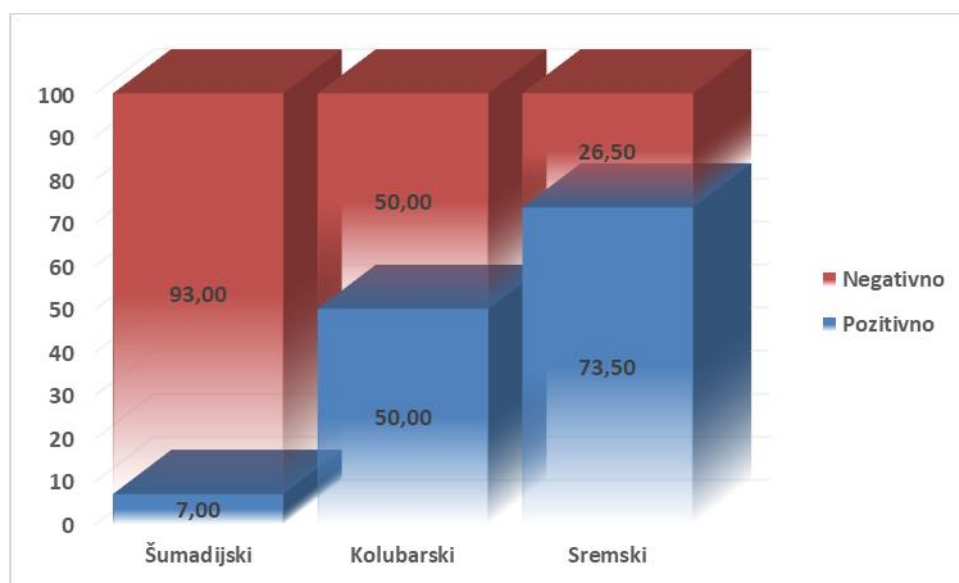
Grafikon 11. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca na osnovu pola

Tabela 17. Analiza varijabilnosti prisustva HEV-a kod uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca u odnosu na pol

| Pol | Ženski |
|-------|--------|
| Muški | 0,869 |

5.2.7.2. Analiza teritorijalne distribucije HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica

Analizom statističkih parametara dobijenih ispitivanjem uzoraka jetre sa linije po okruzima u Republici Srbiji, moglo se zaključiti koliko je bilo pozitivnih, a koliko negativnih uzoraka na prisustvo ovog virus. Broj obrađen uzoraka po svakom okrugu iznosio je 200 uzoraka. Od ukupnog broj uzoraka statističkom analizom ustanovljeno je da je u Šumadijskom okrugu bilo 14 (7,00%) pozitivnih i 186 (93,00%) negativnih uzoraka na ispitivani virus. Prilikom analiziranja Kolubarskog okruga, utvrđen je jednak broj pozitivnih i negativnih uzoraka – 100 (50%). Daljom analizom, ustanovljeno je prisustvo virusa i u Sremskom okrugu i to kod 147 (73,50%) uzoraka, dok je preostalih 53 (26,50%) bilo negativno. Statistički signifikantne razlike $p < 0,001$ javile su se između svih ispitivanih okruga.



Grafikon 12. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca grupisani prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

Tabela 18. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisustva HEV-a kod uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca

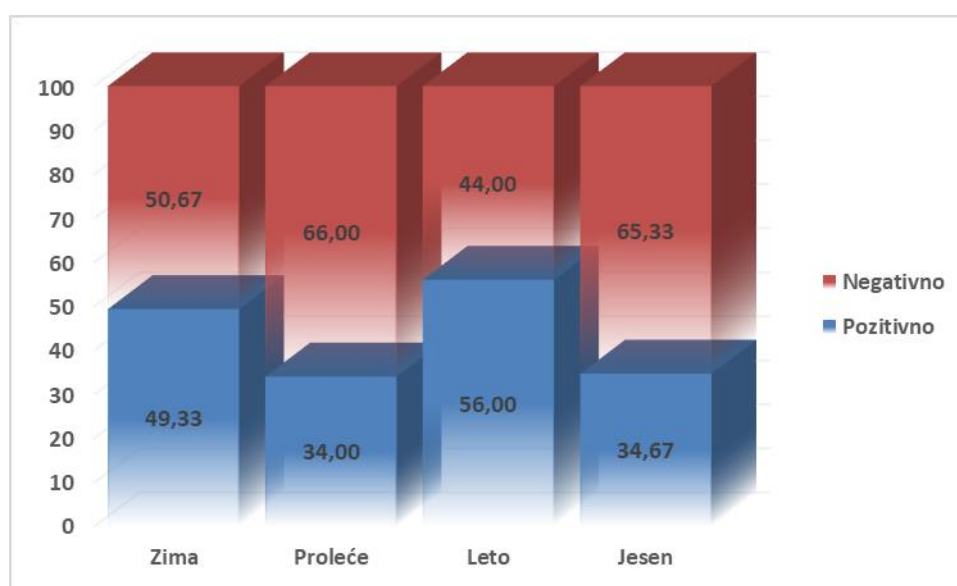
| Okrug | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|-----------|
| Šumadijski | <0,001*** | <0,001*** |
| Kolubarski | | <0,001*** |

Legenda:

1. *** < 0,001

5.2.7.3. Analiza sezonske distribucije HEV-a uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica

Statistička analiza uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca sa linije klanja na prisutvo HEV-a vršena je kroz sva četiri godišnja doba. Broj analiziranih uzoraka iznosio je 150 po svakom godišnjem dobu. Od ukupnog broj uzoraka, statističkom analizom, u toku zime ustanovljena su 74 (49,33%) pozitivna i 76 (50,67%) negativna uzorka na ispitivani virus. Tokom proleća na prisustvo ovog virusa bilo je pozitivno 51 (34,00%) uzorak, dok je 99 (66,00%) bilo negativno. Daljom analizom, potvrđeno je prisustvo virusa i u letnjem periodu i to kod 84 (56,00%) uzorka, dok je 66 (44,00%) bilo negativno. U jesen, od ukupnog broja uzoraka, 52 (34,67%) bilo je pozitivno, a kod 98 (65,33%) nije ustanovljeno prisustvo HEV-a. Statistički signifikantne razlike $p < 0,001$ bile su među godišnjim dobima proleća/leta i leto/jesen. Između zime i proleća statistički je zabeležena značajna razlika $p < 0,01$, dok se između sezona zima i jesen javila statistički značajna razlika $p < 0,05$.



Grafikon 13. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca u odnosu na godišnja doba

Tabela 19. Analiza sezonske varijabilnosti prisustva HEV-a kod uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca

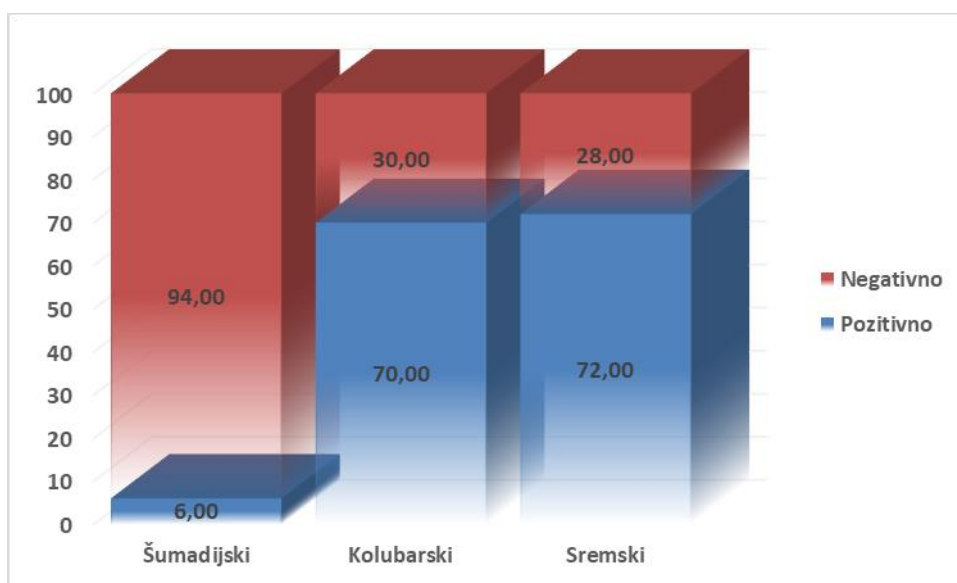
| Godišnje doba | Proleće | Leto | Jesen |
|---------------|---------|-----------|-----------|
| Zima | 0,001** | 0,298 | 0,014* |
| Proleće | | <0,001*** | >0,999 |
| Leto | | | <0,001*** |

Legenda:

1. * < 0,5
2. ** < 0,01
3. *** < 0,001

5.2.7.4. Analiza teritorijalne distribucije HEV-a po sezonama uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca poreklom iz klanica

Analiza uzorka jetre sa linije klanja mlađih od 3 meseca izvršena je prema okruzima (Šumadijski, Kolubarski i Sremski) i godišnjim dobima. U zimskom periodu ispitano je po 50 uzoraka iz svakog okruga. U Šumadijskom okrugu, od ukupnog broja, broj pozitivnih bio je 3 (6,00%), dok je 47 (94,00%) bilo negativno na prisustvo HEV-a. Nasuprot tome, u Kolubarskom okrugu, pozitivnih uzoraka na prisustvo ovog virusa bilo je 35 (70,00%), dok je ostalih 15 (30,00%) bilo negativno. Dobijeni rezultati uzoraka iz Sremskog okruga, u toku zime, pokazali su približno istu odnos pozitivnih i negativnih kao kod prethodno spomenutog okruga. Pozitivnih uzoraka bilo je 36 (72,00%), dok je negativno bilo 14 (28,00%). Statistički značajna razlika $p < 0,001$ javila se između Šumadijskog i Kolubarskog, kao i između Šumadijskog i Sremskog okruga.



Grafikon 14. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca u zimskom kvartalu, a prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

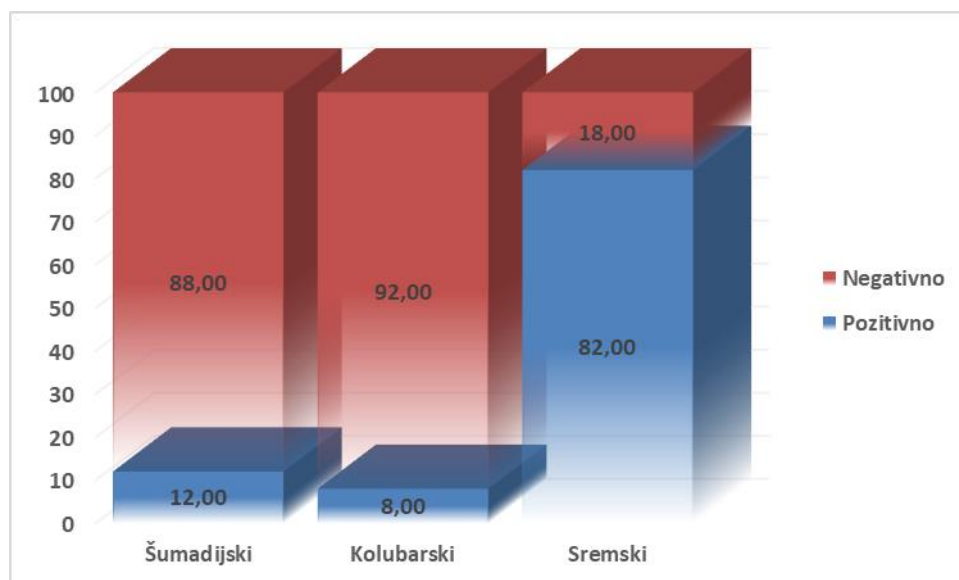
Tabela 20. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisustva HEV-a kod uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca tokom zime

| Zima | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|-----------|
| Šumadijski | <0,001*** | <0,001*** |
| Kolubarski | | >0,999 |

Legenda:

1. *** < 0,001

U prolećnoj sezoni, takođe, ispitano je po 50 uzoraka iz svakog okruga. U Šumadijskom okrugu, broj pozitivnih HEV rezultata zabeležen je kod 6 (12,00%) uzoraka, dok je 44 (88,00%) bilo negativno na ispitivani virus. Dobijenim rezultatima, u Kolubarskom okrugu, ustanovljena su 4 (8,00%) pozitivna uzorka, dok kod ostalih 46 (92,00%) uzoraka nije utvrđeno prisustvo ovog virusa. Kod Sremskog okruga, u toku proleća, broj pozitivnih uzoraka bio je 41 (82,00%), a negativnih 9 (18,00%). Statistički značajna razlika $p < 0,001$ javila se između Šumadijskog i Sremskog, kao i između Kolubarskog i Sremskog okruga.



Grafikon 15. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca u prolećnom kvartalu, a prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

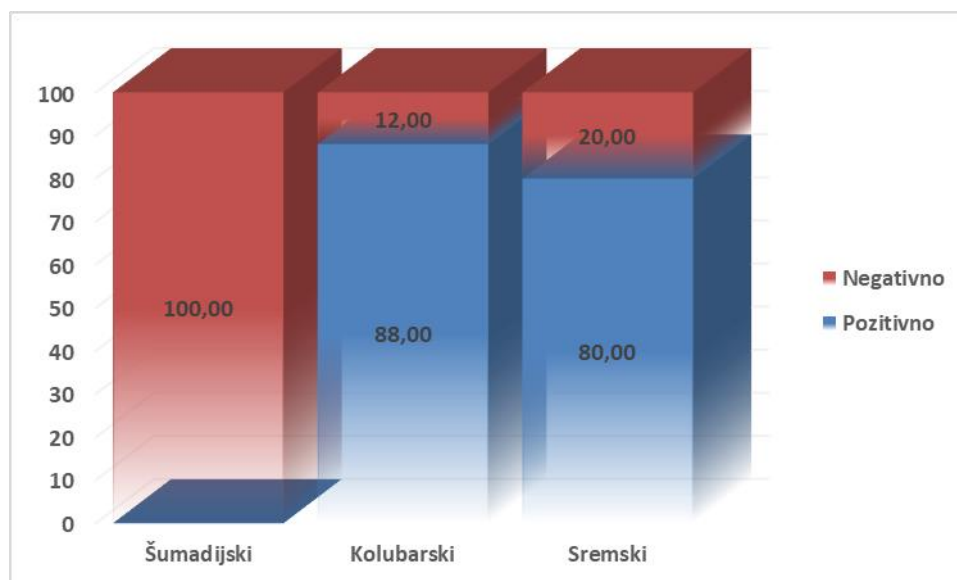
Tabela 21. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisustva HEV-a kod uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca tokom proleća

| Proleće | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|-----------|
| Šumadijski | 0,741 | <0,001*** |
| Kolubarski | | <0,001*** |

Legenda:

1. *** < 0,001

Statističkom analizom na prisustvo HEV-a kod uzoraka poreklom od jedinki mlađih od 3 meseca, u letnjem periodu dobijeni su sledeći rezultati. U Šumadijskom okrugu, tokom leta, nije zabeležen pozitivan uzorak. Kada je reč o Kolubarskom okrugu, pozitivnih uzoraka bilo je 44 (88,00%), a 6 (12,00%) uzoraka bilo je negativno. Tokom letnje sezone, u Sremskom okrugu, broj pozitivnih uzoraka bio je 40 (80,00%), dok je preostalih 10 (20,00%) bilo negativno. Statistički značajna razlika $p < 0,001$ javila se između Šumadijskog i Kolubarskog, kao i između Šumadijskog i Sremskog okruga.



Grafikon 16. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca u letnjem kvartalu, a prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

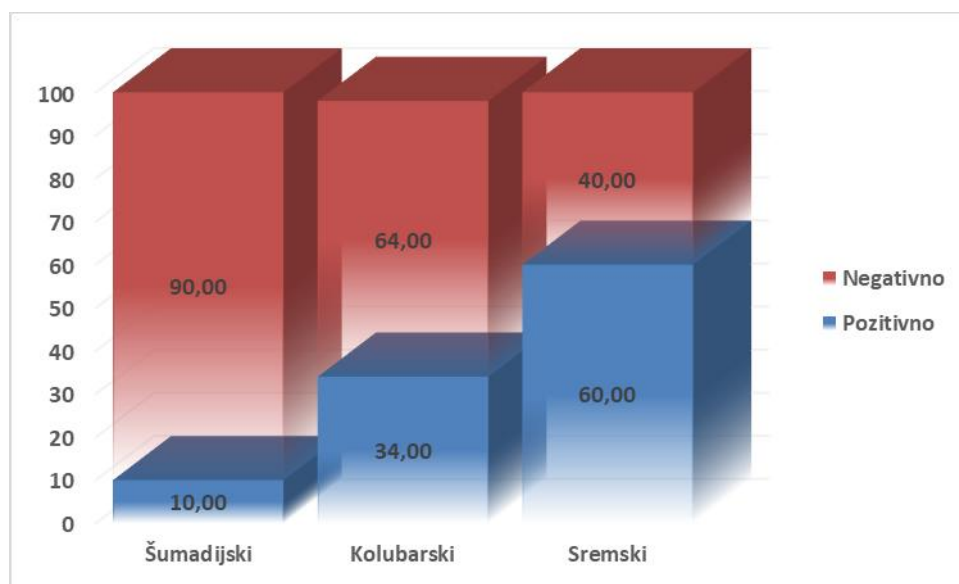
Tabela 22. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisustva HEV-a kod uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca tokom leta

| Leto | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|-----------|
| Šumadijski | <0,001*** | <0,001*** |
| Kolubarski | | 0,414 |

Legenda:

1. *** < 0,001

Tokom jeseni, ispitano je po 50 uzoraka u svim okruzima. Statističkom analizom utvrđeno je 5 (10,00%) pozitivnih uzoraka u Šumadijskom okrugu, dok je 45 (90,00%) bilo negativno. Nasuprot tome, kod Kolubarskom okrugu, pozitivnih uzoraka bilo je 17 (34,00%), a 33 (66,00%) bilo je negativno. Kod Sremskog okruga, tokom jeseni, broj pozitivnih uzoraka bio je 30 (60,00%), dok je preostalih 20 (40,00%) uzoraka bilo negativno. Statistički značajna razlika javila se između svih ispitivanih okruga. Između Šumadijskog i Sremskog javila se statistički značajna razlika $p < 0,001$, kao i između Šumadijskog i Kolubarskog.. Za razliku od toga, između Kolubarskog i Sremskog bila je $p < 0,05$.



Grafikon 17. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca u jesenjem kvartalu, a prema okruzima iz kojih su uzorci prikupljeni

Tabela 23. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisustva HEV-a kod uzoraka jetri od svinja mlađih od 3 meseca tokom jeseni

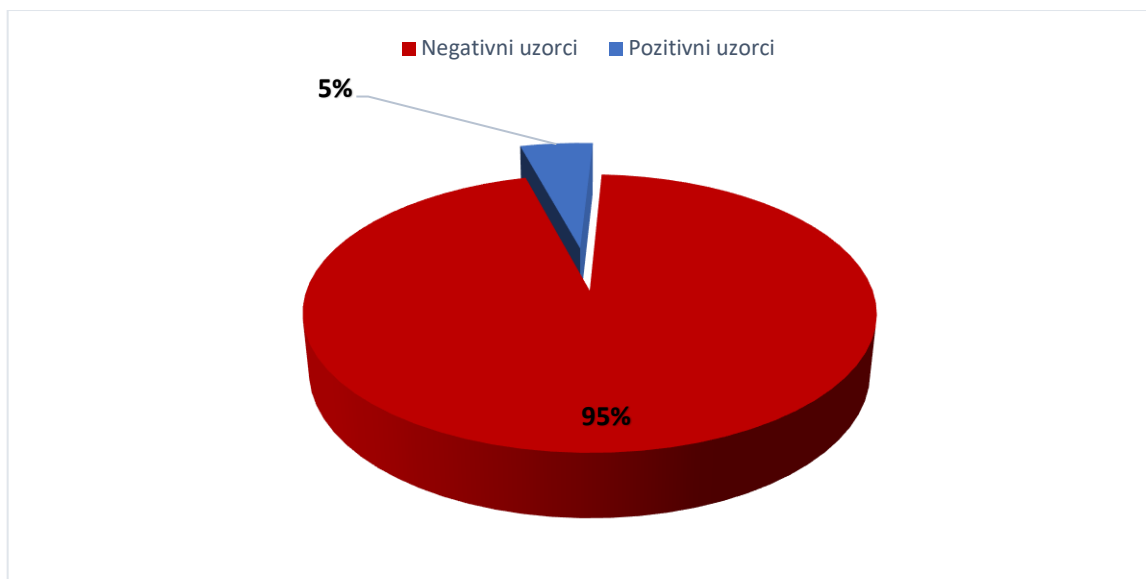
| Jesen | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|-----------|
| Šumadijski | 0,007** | <0,001*** |
| Kolubarski | | 0,016* |

Legenda:

1. * < 0,05
2. ** < 0,01
3. *** < 0,001

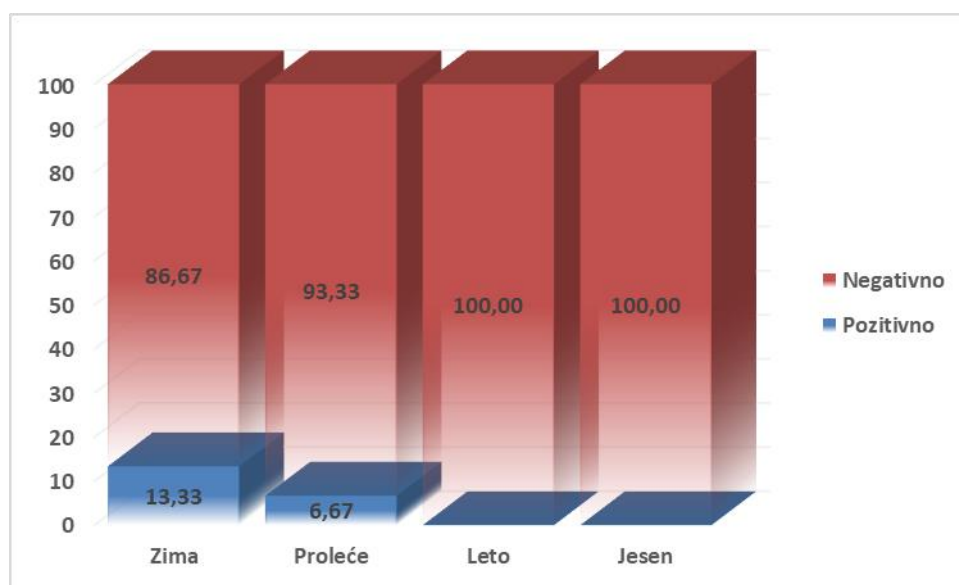
5.2.8. Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a iz uzoraka jetri iz maloprodaje

Obradom dobijenih podataka poreklom od uzoraka iz maloprodajnih objekata, ustanovljeno je prisustvo HEV-a kod 3 (5%) uzorka, dok je 57 (95%) uzoraka bilo negativno (Grafikon 18).



Grafikon 18. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetre svinja poreklom iz maloprodajnih objekata

Statistička analiza dalje je urađena na osnovu četiri godišnja doba. Broj analiziranih uzoraka iznosio je 15 po svakom godišnjem dobu. Od ukupnog broj uzoraka statističkom analizom ustanovljeno je da su se u toku zime javila dva (13,33%) pozitivna i 13 (86,67%) negativnih uzoraka na ispitivani virus. Tokom proleća jedan uzorak (6,67%) bio je pozitivan, dok je 14 (93,33%) bilo negativno. U letnjem i jesenjem periodu nisu ustanovljeni pozitivni uzorci. Budući da su tokom zimske sezone utvrđena dva pozitivna, a tokom prolećne jedan pozitivan uzorak, statistički signifikantne razlike nisu se javile između ispitivanih godišnjih doba $p > 0,05$.



Grafikon 19. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka jetri svinja poreklom iz maloprodajnih objekata

Tabela 24. Analiza sezonske varijabilnosti prisustva HEV-a kod uzoraka poreklom iz maloprodajnih objekata

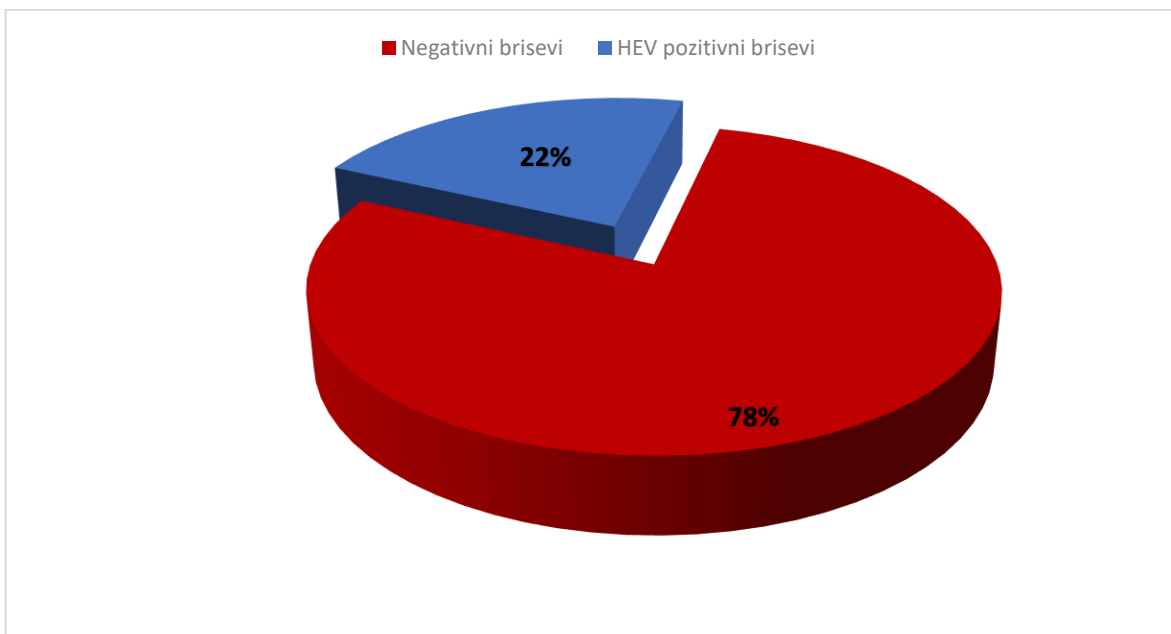
| Godišnje doba | Proleće | Leto | Jesen |
|---------------|---------|--------|--------|
| Zima | 0,146 | 0,211 | 0,211 |
| Proleće | | >0,999 | >0,999 |
| Leto | | | >0,999 |

5.2.9. Prisustvo, zastupljenost i statistička analiza HEV-a u uzorcima briseva površina i opreme sa linije klanja svinja

Ispunjen je i deo unapred definisanog plana, a koji se odnosio na prikupljanje uzoraka briseva sa površina u klanicama koje dolaze u kontakt sa jetrama. Analizom dobijenih rezultata uzoraka sa površina (nož, masat, metalni sto, PVC daska, plastična lodna) utvrđeno je prisustvo HEV-a kod 13 uzoraka (22%), dok je negativno bilo 47 (78%) briseva (Grafikon 20).

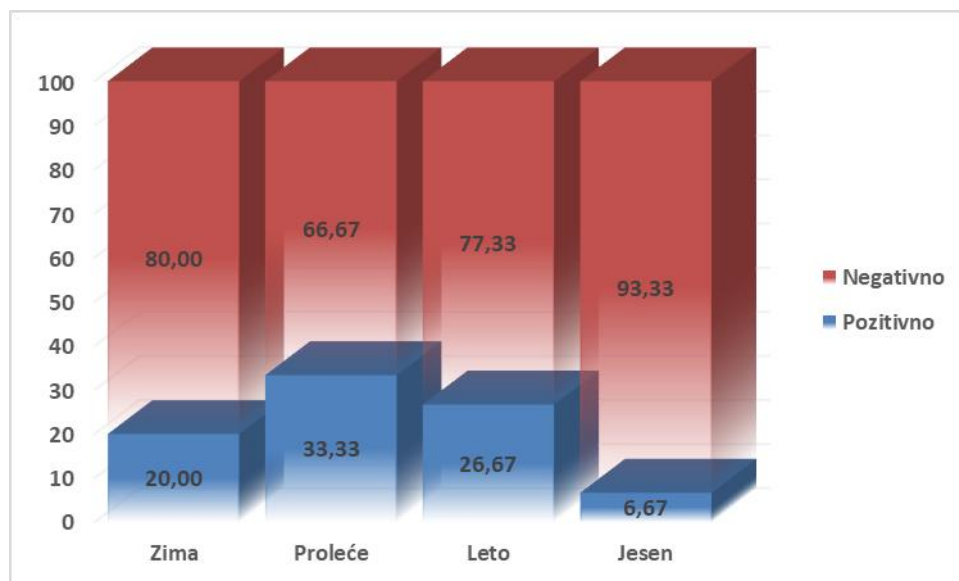
Tabela 25. Tabela prikaz pozitivnih uzoraka sa površine i opreme

| Redni broj | Oprema ili površina sa koje je uzet bris | Okrug iz kog potiče uzorak | Sezona tokom koje je izvršeno uzorkovanje |
|------------|--|----------------------------|---|
| 1. | Nož | Sremski | Zima |
| 2. | PVC daska | Sremski | Zima |
| 3. | Metalni sto | Sremski | Zima |
| 4. | Nož | Sremski | Proleće |
| 5. | Nož | Sremski | Proleće |
| 6. | Masat | Sremski | Proleće |
| 7. | Metalni sto | Sremski | Proleće |
| 8. | PVC lodna | Sremski | Proleće |
| 9. | Metalni sto | Kolubarski | Leto |
| 10. | Metalna površina | Kolubarski | Leto |
| 11. | Nož | Kolubarski | Leto |
| 12. | PVC lodna | Sremski | Leto |
| 13. | PVC lodna | Sremski | Jesen |



Grafikon 20. Procentualna zastupljenost HEV-a kod briseva uzorkovanih sa površina na liniji klanja

Statistička analiza ispitivanja briseva sa linije klanja na prisutvo HEV-a vršena je na osnovu sva četiri godišnja doba. Broj obrađenih uzoraka briseva iznosio je 15 po svakom godišnjem dobu. Od ukupnog broj uzoraka, statističkom analizom ustanovljeno je da je u toku zime bilo 3 (20,00%) pozitivna i 12 (80,00%) negativnih briseva na ispitivani virus. Tokom proleća bilo je pozitivno 5 (33,33%), dok je 10 (66,67%) bilo negativno. Za razliku od toga, tokom letnjeg perioda, ustanovljena su 4 (26,67%) pozitivna brisa i 11 (73,33%) negativnih. U jesenjem periodu, takođe, ustanovljeno je prisustvo HEV-a na površinama. Pozitivan je bio 1 (6,67%) bris, dok su ostalih 14 (93,33%) bili negativni. Statistički značajne razlike nisu se javile između ispitivanih godišnjih doba.

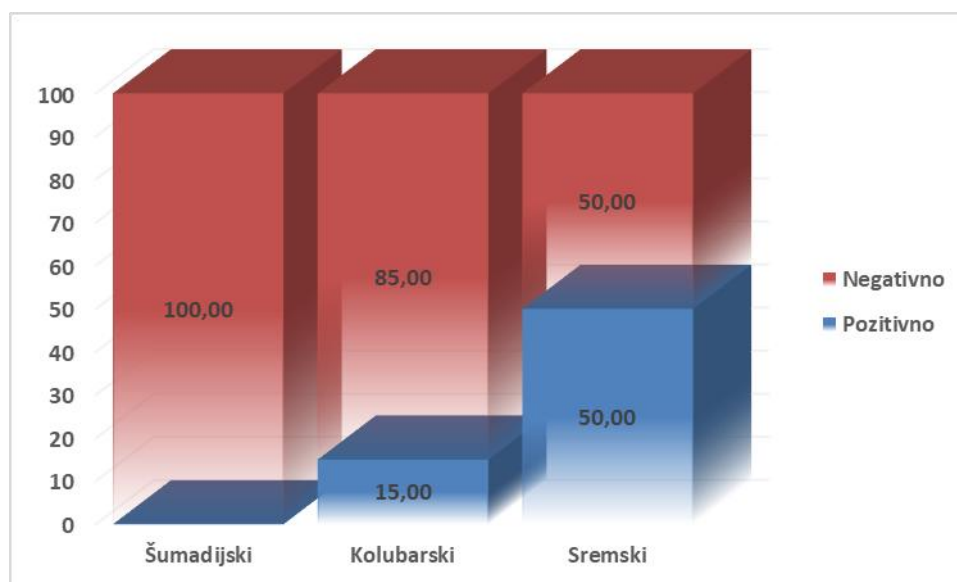


Grafikon 21. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka briseva sa površina na liniji klanja koje dolaze u kontakt sa jetrama, grupisani prema godišnjim dobima

Tabela 26. Analiza sezonske varijabilnosti prisustva HEV-a kod briseva

| Godišnje doba | Proleće | Leto | Jesen |
|---------------|---------|--------|-------|
| Zima | 0,682 | >0,999 | 0,598 |
| Proleće | | >0,999 | 0,169 |
| Leto | | | 0,330 |

Statistička analiza uzoraka briseva sa linije klanja na prisustvo HEV-a izvršena je i na osnovu okruga iz kog potiču brisevi (Šumadijski, Kolubarski i Sremski). Ukupan broj ispitivanih uzoraka sa površina iznosio je 20 briseva po svakom okrugu. Dobije rezultati pokazali su da nije utvrđeno prisustvo HEV u uzorcima briseva, u Šumadijskom okrugu. Nasuprot tome, kada je reč o Kolubarskom okrugu, pozitivnih uzoraka briseva bilo je 3 (15,00%), a 17 (85,00%) njih bilo je negativno. Kod Sremskog okruga, utvrđen je najveći broj pozitivnih uzoraka 10 (50,00%), dok je preostalih 10 (50,00%) bilo negativno. Statistički značajna razlika javila se između Šumadijskog i Sremskog okruga $p < 0,001$, zatim Kolubarskog i Sremskog okruga $p < 0,05$.



Grafikon 22. Procentualna zastupljenost HEV-a kod uzoraka briseva sa površina na liniji klanja koje dolaze u kontakt sa jetrama, grupisani prema okruzima sa kojih potiču

Tabela 27. Analiza teritorijalne varijabilnosti prisustva HEV-a kod briseva

| Okrug | Kolubarski | Sremski |
|------------|------------|------------|
| Šumadijski | 0,231 | < 0,001*** |
| Kolubarski | | 0,041* |

Legenda:

1. * < 0,5

2. *** < 0,001

5.3. Genetička identifikacija i filogenetska analiza izolata HEV-a

Za sekvenciranje i genotipsku karakterizaciju izabrano je 56 izolata virusa hepatitisa E koji su pokazali najmanje Ct vrednosti u RT-qPCR-u, odnosno imali najveći broj kopija virusa, vodeći pri tome računa o ravnomernoj zastupljenosti po okrugu, sezoni, kao i vrsti uzorka uzorkovanja.

Nakon sekvenciranja, obradom dobijenih elektroferograma, zadržane su nukleotidne sekvence ukupno 52 izolata virusa hepatitisa E, dok su sekvence dobijene iz 4 uzorka (SRB-HEV-133K-2020, SRB-HEV-55R-2020, SRB-HEV-62S-2020 i SRB-HEV-76S-2020,) odbačene zbog lošeg kvaliteta elektroferograma. Posle poravnanja, sekvence su skraćene na dužinu od 493 bazna para.

Filogenetsko stablo, konstruisano na osnovu sekvence ORF2 regiona, prikazano je na slici 6. Osim sekvenci izabranih izolata, u filogenetsko stablo uključene su sekvence referentnih izolata virusa hepatitisa A (preuzete iz HEVNET-a) radi verodostojnog utvrđivanja pripadnosti naših izolata pojedinačnim subgenotipovima.

Na filogenetskom stablu uočavaju se četiri (4) glavna klastera. Klaster I obuhvata 43 primoizolata virusa hepatitisa E koji pripadaju genotipu HEV-3 i subgenotipu HEV-3a. Ispitivanjem matrice genetičkih distanci između izolata virusa HEV-3a dobijenih analizom sekvenci ORF2 regiona (Tabela 28) utvrđeno je da je prosečna genetička udaljenost 6,5%, najmanja 0%, a najveća 13,1%. Određene sekvence iz uzoraka, poreklom iz istih okruga apsolutno se ne razlikuju (0% genetičke udaljenosti), a to su:

- 115SH-121SH
- 149S-150S
- 169K-173K
- 185S-162S
- 191S-173S
- 43S-25S
- 45S-25S
- 45S-43S
- 73K-51K
- 82K-67K

Nasuprot tome, kod određenog broja parova sekvenci genetička udaljenost veća je od 10%. To je naročito izraženo za sledeće uzorke:

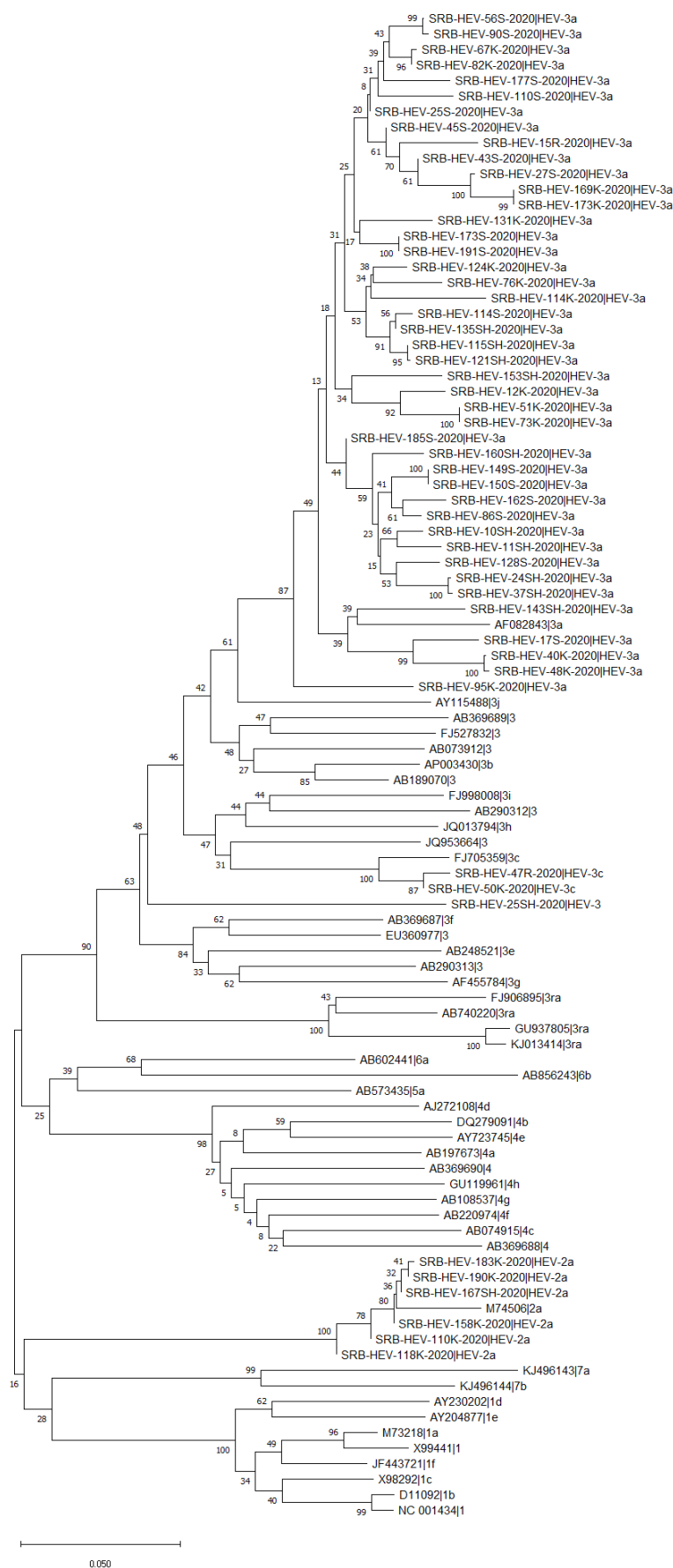
- 110S-AF
- 40K-15R
- 48K-15R
- 17S-169K
- 40K-169K
- 48K-169K
- 51K-169K
- 73K-169K
- 143SH-173K
- 48K-173K
- 51K-173K
- 95K-40K

- 95K-48K

Na osnovu dobijenih rezultata ustanovili smo da postoji značajna genetička udaljenost između sekvenci dobijenih iz uzoraka prikupljenih u istoj sezoni, ali sa različitog geografskog porekla. Tako je zabeležena genetička udaljenost veća od 10% između Šumadijskog i Kolubarskog (143SH-114K; 143SH-173K; 143SH-169K), kao i Sremskog u odnosu na Kolubarski (27S-40K; 27S-48K). Takođe, značajna genetička udaljenost sekvenci dobijenih iz uzoraka zabeležena je i između pojedinih sekvenci sa istog geografskog područja, ali različite sezone uzorkovanja (169K-114K; 173K-114K; 12K-169K; 17S-110S; 17S-173; 95K-114K).

Tabela 28. Matrica K2P genetičkih distanci između izolata virusa HEV-3a dobijena analizom sekvenci ORF2 regiona
Tabela data u Prilogu 1

Slika 6. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu sekvenci ORF2 regiona HEV-a. Brojevi iznad grana predstavljaju statističku podršku.



Klaster II obuhvata 2 sekvence dobijene iz uzoraka, subgenotip 3c koji se genetički izrazito malo (< 5%) razlikuju od referentnog soja FJ705359.

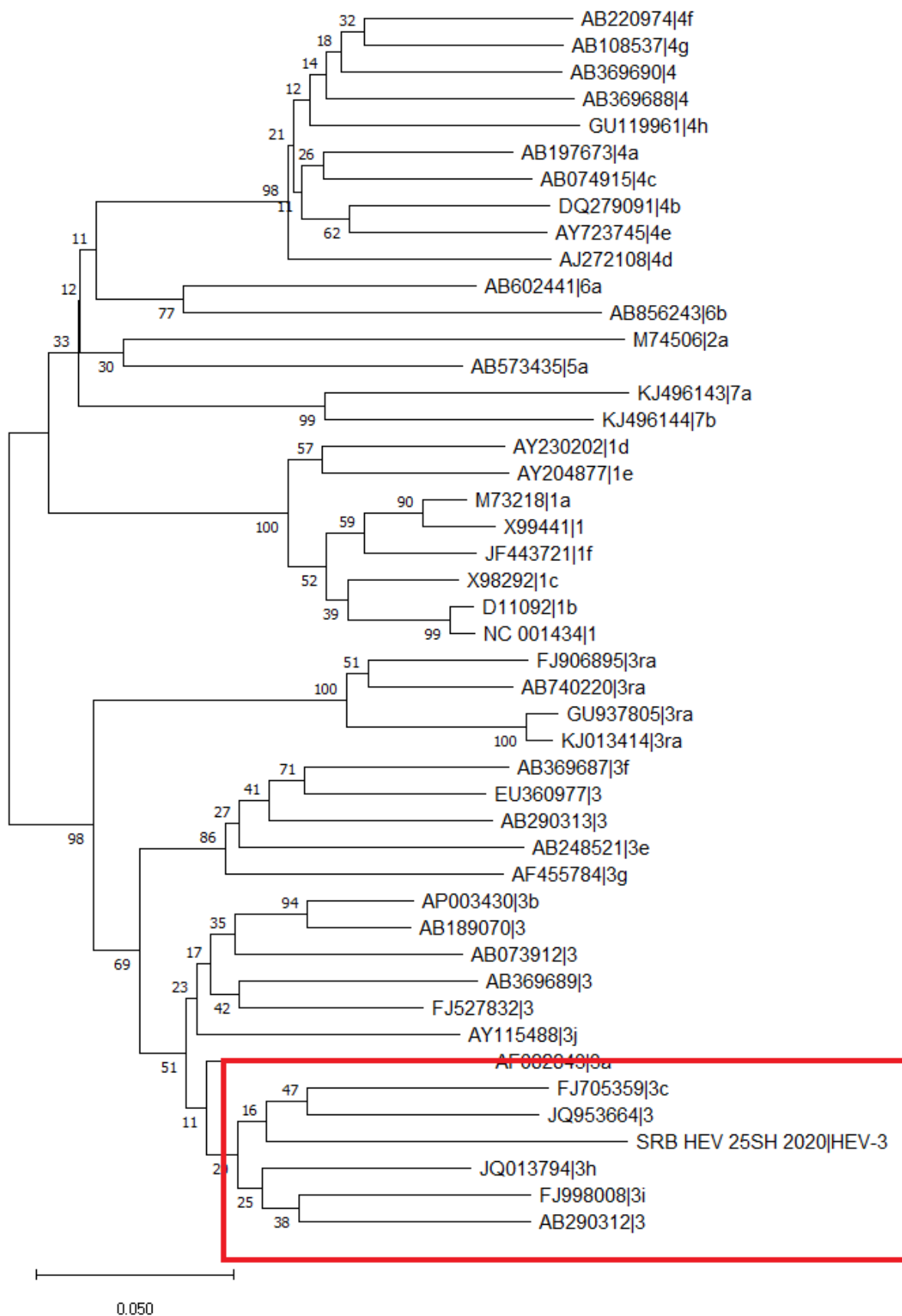
Klaster III obuhvata 6 sekvenci virusa hepatitisa E, subgenotip 2a, koji su najbliži referentnom soju M74506. Ispitivanjem matrice genetičkih distanci između ovih sekvenci (Tabela 29) utvrđeno je da je najmanja genetička udaljenost 0%, a najveća 5,2%. Zanimljivo je da između svih 6 sekvenci iz uzoraka, genetička udaljenost skoro 0%, dok se u odnosu na referentnu sekvencu razlikuju veoma malo – od 2,8 do 5,2%:

Tabela 29. Matrica K2P genetičkih distanci između izolata virusa HEV-2a dobijena analizom sekvenci ORF2 regiona

| | SRB-HEV-110K | SRB-HEV-118K | SRB-HEV-158K | SRB-HEV-167SH | SRB-HEV-183K | SRB-HEV-190K | M74506 2a |
|---------------------------|--------------|--------------|--------------|---------------|--------------|--------------|-----------|
| SRB-HEV-110K-2020 HEV-2a | | | | | | | |
| SRB-HEV-118K-2020 HEV-2a | 0,004 | | | | | | |
| SRB-HEV-158K-2020 HEV-2a | 0,000 | 0,004 | | | | | |
| SRB-HEV-167SH-2020 HEV-2a | 0,000 | 0,004 | 0,000 | | | | |
| SRB-HEV-183K-2020 HEV-2a | 0,000 | 0,004 | 0,000 | 0,000 | | | |
| SRB-HEV-190K-2020 HEV-2a | 0,000 | 0,004 | 0,000 | 0,000 | 0,000 | | |
| M74506 2a | 0,029 | 0,052 | 0,028 | 0,028 | 0,029 | 0,028 | |

Klaster IV obuhvata samo jednu sekvencu dobijenu iz uzorka, za koji filogenetskom analizom nije bilo moguće svrstavanje u određeni subgenotip. Radi se o sekvenci SRB-HEV-25SH-2020|HEV-3, za koji se sa verovatnoćom od 88% može potvrditi pripadanost genotipu HEV-3, a ispitivanjem genetičke udaljenosti utvrđeno je da je ova sekvencija najbliži klasteru HEV-3c, HEV-3h i HEV-3i (slika 7).

Slika 7. Filogenetsko stablo konstruisano na osnovu sekvenci ORF2 regiona HEV-a. Brojevi iznad grana predstavljaju statističku podršku.



5.4. Kvantifikacija pozitivnih HEV-nih uzoraka iz tkiva jetri

Ukupno 960 uzoraka jetri testirano je na moguće prisustvo HEV-a. Budući da je virus utvrđen kod 264 uzorka, ti uzorci odabrani su za dalju kvantifikaciju. Naš cilj bio je da kod svih pozitivnih uzoraka jetri utvrdimo broj genomskih kopija po gramu uzorka. Na osnovu dobijenih rezultata, ustanovili smo opterećenost tkiva jetre ovim virusom. Analizom dobijenih rezultata, došli smo do saznanja da među pozitivnim uzorcima, prosečan broj \log_{10} genomskih kopija po gramu tkiva jetre iznosi 4,41, sa standarnom devijacijom od 1,69. Kod pozitivnih uzoraka poreklom iz maloprodaje (3), broj genomskih kopija HEV-a po gramu tkiva jetre bio je u intervalu od 1,90 do 4,3.

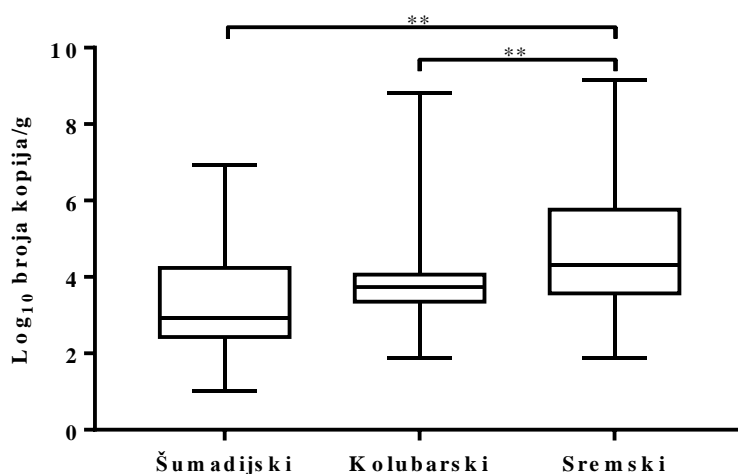
Daljom statističkom obradom podataka, pokušali smo da ispitamo potencijalno značajne statističke razlike između pozitivnih uzoraka, a na osnovu već definisanih stratifikacija uzoraka (po okruzima i sezonama).

5.4.1. Analiza broja genomskih kopija HEV-a prema okruzima

Tabela 30. Deskriptivne statističke vrednosti broja genomskih kopija HEV-a prema okruzima

| Grupa | n | Me | Q ₁ | Q ₃ | X max | X min | CV (%) |
|------------|-----|------|----------------|----------------|-------|-------|--------|
| Šumadijski | 14 | 2,94 | 2,43 | 4,24 | 6,94 | 1,00 | 47,86 |
| Kolubarski | 100 | 3,74 | 3,36 | 4,06 | 8,81 | 1,88 | 38,87 |
| Sremski | 147 | 4,30 | 3,57 | 5,76 | 9,16 | 1,87 | 35,11 |

Analizirajući deskriptivne statističke pokazatelje \log_{10} broja genomskih kopija/g HEV-a, ustanovljeno je da je medijana najvećeg broja \log_{10} kopija/g bila u Sremskom okrugu 4,30, sa rasponom prvog i trećeg kvartala od 3,57-5,76. Dobijeni rezultat je statistički vrlo značajno viši ($p < 0,01$) u odnosu na Kolubarski i Šumadijski okrug. U ova dva okruga medijane su iznosile 3,74 i 2,94. Koeficijent varijacije kod ispitivanih okruga bio je najniži kod Sremskog (35,11%), a najviši kod Šumadijskog okruga (47,86%).



Grafikon 23. Grafički prikaz vrednosti broja genomskih kopija HEV-a prema okruzima

Legenda:

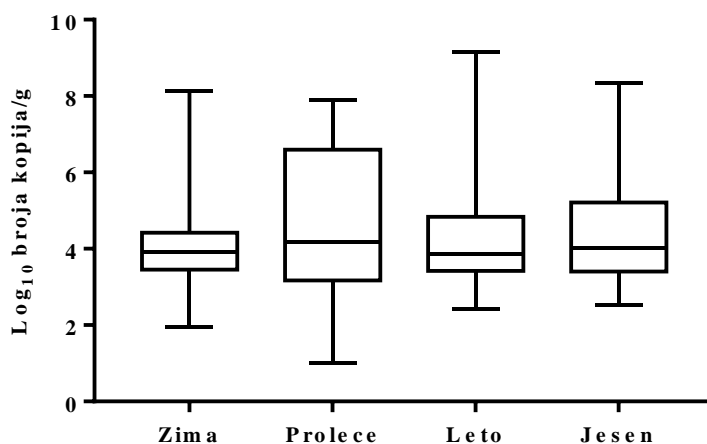
1.** < 0,01

5.4.2. Analiza broja genomskih kopija HEV-a prema sezonama

Tabela 31. Deskriptivne statističke vrednosti broja genomskih kopija HEV-a prema sezonama

| Grupa | n | Me | Q ₁ | Q ₃ | X max | X min | CV (%) |
|---------|----|------|----------------|----------------|-------|-------|--------|
| Zima | 74 | 3,93 | 3,46 | 4,42 | 8,14 | 1,95 | 29,68 |
| Proleće | 51 | 4,18 | 3,17 | 6,60 | 7,89 | 1,00 | 41,33 |
| Leto | 84 | 3,87 | 3,43 | 4,84 | 9,16 | 2,41 | 41,67 |
| Jesen | 52 | 4,01 | 3,40 | 5,21 | 8,34 | 2,54 | 34,73 |

Daljom analizom deskriptivnih statističkih pokazatelja \log_{10} broja genomskih kopija/g HEV-a na onovu sezona, ustanovljeno je da je medijana najnižeg broja \log_{10} kopija/g bila u leto 3,87, sa rasponom prvog i trećeg kvartala od 3,43-4,84. Za razliku od toga, medijana najvećeg broja \log_{10} kopija/g bila je u proleće 4,18 (3,17-6,60). Između svih ispitivanih sezona nije utvrđena statistički značajna razlika ($p > 0,05$). Ispitivani koeficijent varijacije bio je najviši tokom leta (41,67%), dok je tokom zime koeficijent varijacije bio najniži (29,68%).



Grafikon 24. Grafički prikaz vrednosti broja genomskih kopija HEV-a prema sezonama

Legenda:

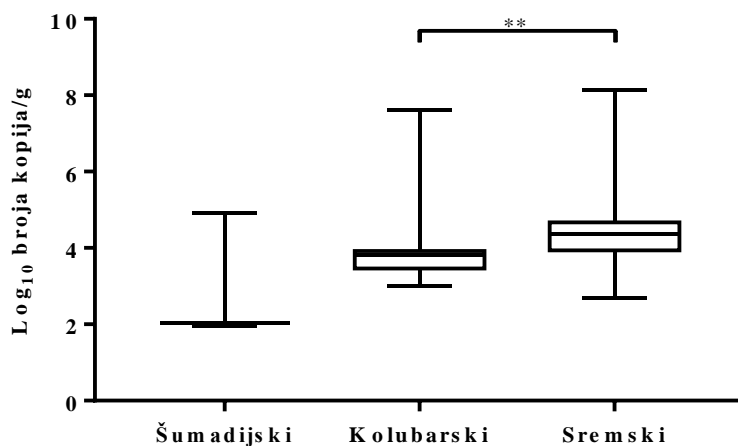
1. * < 0,5
2. ** < 0,01
3. *** < 0,001

5.4.3. Analiza broja genomskih kopija HEV-a tokom zime, a prema okruzima

Tabela 32. Deskriptivne statističke vrednosti broja genomskih kopija HEV-a za sezonu zimu

| Grupa | n | Me | Q ₁ | Q ₃ | X max | X min | CV (%) |
|------------|----|------|----------------|----------------|-------|-------|--------|
| Šumadijski | 3 | 2,04 | 1,95 | 4,91 | 4,91 | 1,95 | 56,73 |
| Kolubarski | 35 | 3,81 | 3,46 | 3,92 | 7,62 | 3,00 | 19,26 |
| Sremski | 36 | 4,38 | 3,94 | 4,67 | 8,14 | 2,70 | 31,12 |

Analizirajući deskriptivne statističke pokazatelje \log_{10} broja genomskih kopija/g HEV-a tokom zimske sezone, ustanovljeno je da je medijana najvećeg broja \log_{10} kopija/g bila u Sremskom okrugu 4,38, sa rasponom prvog i trećeg kvartala od 3,94-4,67. Kada smo uporedili medijane među okruzima, došli smo do saznanja da je u Sremskom okrugu statistički vrlo značajno viša ($p < 0,01$) u odnosu na Kolubarski okrug 3,81 (3,46-3,92). Koeficijent varijacije kod ispitivanih okruga bio je najniži kod Kolubarskog (19,26%), a najviši kod Šumadijskog okruga (56,73%).

**Grafikon 25.** Grafički prikaz broja genomskih kopija HEV-a po okruzima za sezonu zima

Legenda:

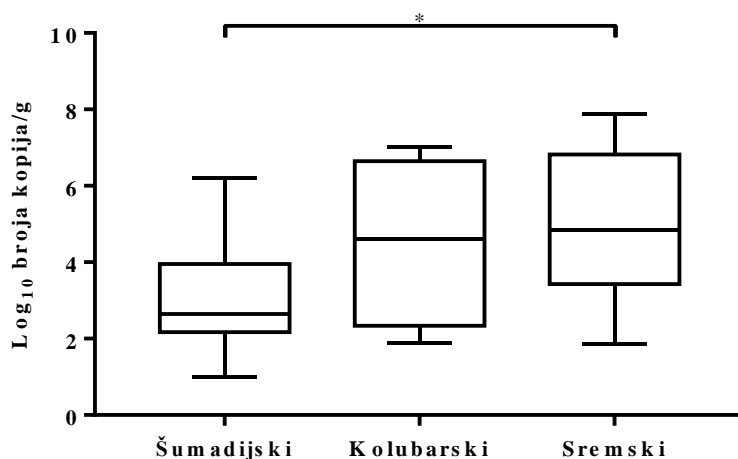
1.** < 0,01

5.4.4. Analiza broja genomskih kopija HEV-a tokom proleća, a prema okruzima

Tabela 33. Deskriptivne statističke vrednosti broja genomskih kopija HEV-a za sezonu proleće

| Grupa | n | Me | Q ₁ | Q ₃ | X max | X min | CV (%) |
|------------|----|------|----------------|----------------|-------|-------|--------|
| Šumadijski | 6 | 2,65 | 2,17 | 3,96 | 6,21 | 1,00 | 56,44 |
| Kolubarski | 4 | 4,61 | 2,34 | 6,64 | 7,03 | 1,88 | 49,17 |
| Sremski | 41 | 4,86 | 3,43 | 6,82 | 7,89 | 1,87 | 37,60 |

Analizirajući deskriptivne statističke pokazatelje \log_{10} broja genomskih kopija/g HEV-a u proleće, ustanovljeno je da je medijana najvećeg broja \log_{10} kopija/g bila u Sremskom okrugu 4,86, sa rasponom prvog i trećeg kvartala od 3,43-6,82. Ovo je statistički značajno više ($p < 0,05$) u odnosu na Šumadijski okrug 2,65 (2,17-3,96). Koeficijent varijacije kod ispitivanih okruga bio je najniži kod Sremskog okruga (37,60%). Za razliku od toga, najviši koeficijent varijacije bio je kod Šumadijskog okruga (56,44%).

**Grafikon 26.** Grafički prikaz broja genomskih kopija HEV-a po okruzima za sezonu proleće

Legenda:

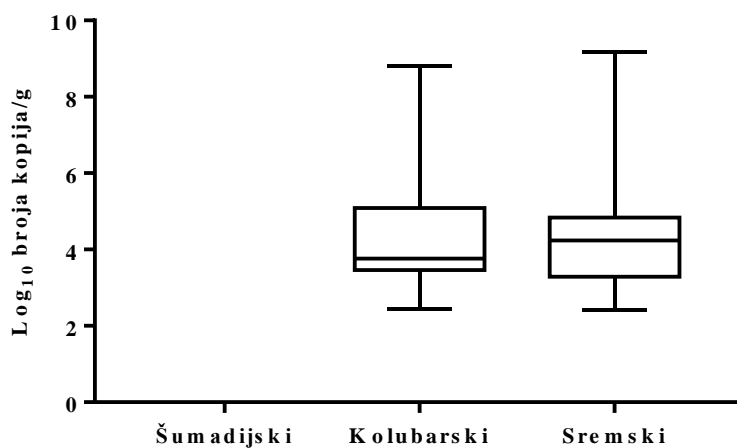
1. * < 0,5

5.4.5. Analiza broja genomskih kopija HEV-a tokom leta, a prema okruzima

Tabela 34. Deskriptivne statističke vrednosti broja kopija HEV-a za sezonu leto

| Grupa | n | Me | Q ₁ | Q ₃ | X max | X min | CV (%) |
|------------|----|------|----------------|----------------|-------|-------|--------|
| Šumadijski | 0 | | | | | | |
| Kolubarski | 44 | 3,76 | 3,46 | 5,09 | 8,81 | 2,43 | 43,03 |
| Sremski | 40 | 4,24 | 3,29 | 4,84 | 9,16 | 2,41 | 40,68 |

Analizirajući deskriptivne statističke pokazatelje \log_{10} broja genomskih kopija/g HEV-a, ustanovljeno je da nije utvrđena statistički značajna razlika ($p < 0,05$) između ispitivanih grupa.



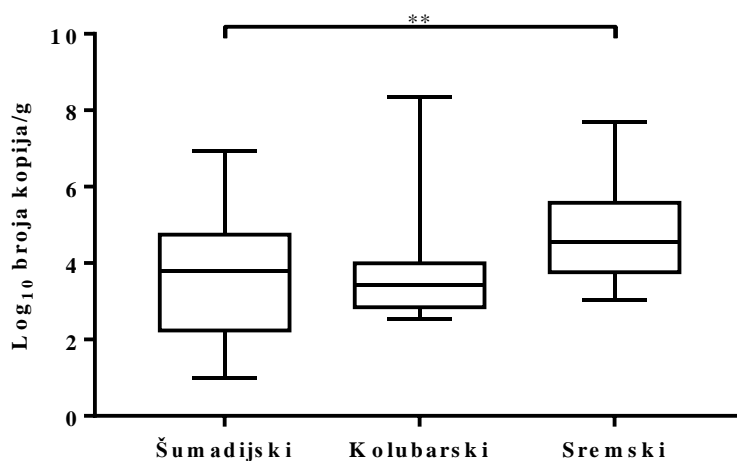
Grafikon 27. Grafički prikaz broja genomskih kopija HEV-a po okruzima za sezonu leto

5.4.6. Analiza broja genomskih kopija HEV-a tokom jeseni, a prema okruzima

Tabela 35. Deskriptivne statističke vrednosti broja genomskih kopija HEV-a za sezonu jesen

| Grupa | n | Me | Q ₁ | Q ₃ | X max | X min | CV (%) |
|------------|----|------|----------------|----------------|-------|-------|--------|
| Šumadijski | 5 | 3,79 | 2,24 | 4,75 | 6,94 | 1,00 | 52,78 |
| Kolubarski | 17 | 3,42 | 2,85 | 3,99 | 8,34 | 2,54 | 44,77 |
| Sremski | 30 | 4,55 | 3,76 | 5,58 | 7,71 | 3,03 | 27,69 |

Analizirajući deskriptivne statističke pokazatelje \log_{10} broja genomskih kopija/g HEV-a u jesen, ustanovljeno je da je medijana najvećeg broja \log_{10} kopija/g bila u Sremskom okrugu 4,55, sa rasponom prvog i trećeg kvartala od 3,76-5,58. U odnosu na prethodni okrug, u Šumadijskom okrugu medijana je iznosila 3,79 (2,24-4,75), što je statistički vrlo značajno niže ($p < 0,01$) u odnosu na Sremski okrug. Koeficijent varijacije kod ispitivanih okruga bio je najniži kod Sremskog (27,69%), a najviši kod Šumadijskog okruga (52,78%).

**Grafikon 28.** Grafički prikaz broja genomskih kopija HEV-a po okruzima za sezonu jesen

Legenda:

1.** < 0,01

6. DISKUSIJA

Virusi kao infektivni agensi predstavljali su, ali i dalje predstavljaju konstantnu pretnju po zdravlje ljudi. Deo ove velike grupe mikroorganizama su i virusi koji se prenose putem hrane. Interes naučne zajednice za viruse prenosive hranom doveo je do toga da ovi patogeni zauzimaju sve značajnije mesto u analizi rizika sa aspekta bezbednosti hrane. Čini se da interesovanje, kako naučne tako i opšte zajednice, naročito tokom prethodne decenije, za ove uzročnike bolesti kod ljudi nikada nije bilo veće. Sa rastom interesovanja i tehnološkim razvojem koji to prati, razvijaju se nove i dopunjuju već postojeće metode zahvaljujući kojima se omogućava lakše otkrivanje, kao i umnožavanje ovih čestica, među kojima je i virus hepatitisa E. Svetska zdravstvena organizacija (World Health Organization - WHO) na osnovu svojih raspoloživih podataka, ukazuje da se na godišnjem nivou virusna infekcija hepatitisom E dijagnostikuje kod oko 20 miliona ljudi u svetu. Najpre su Azija i Afrika okarakterisani kao regioni sa najučestalijom stopom pojave ove bolesti, gde je hepatitis E virus proukovao mnoge epidemije, najčešće prenošen fekalno-oralnim putem, pri čemu je izvor infekcije većinom predstavljala kontaminirana voda. Ipak se sve češće beleže slučajevi oboljenja ljudi uzrokovani ovim virusom nakon konzumiranja kontaminirane hrane. Opsežnim epidemiološkim studijama ustanovljeno je da je u zemljama Evropske Unije kontaminirana hrana dominantni put prenosa ovog oboljenja, kao i da su glavni izvori HEV-a domaće, divlje svinje i jelenska divljač. Prema podacima Evropske agencije za bezbednost hrane, HEV je u evropskim zemljama tokom poslednjih deset godina izazvao oko 20 hiljada akutnih slučajeva oboljenja, sa oko 30 smrtnih ishoda.

Urbanizacija stanovništva, kao i prelasci sa lokalnog na globalno orjentisano tržište hrane, potom trend sve učestalijih putovanja ljudi i transporta životinja, samo su neki od faktora koji doprinose širenju, pored ostalih, i ovog uzročnika u svim delovima sveta. Ovaj patogen predstavlja jedan od sve važnijih problema za javno zdravlje ne samo u nerazvijenim, već i u zemljama u razvoju, kao i u razvijenim. Takođe, za razliku od većine virusnih bolesti koje se prenose hranom, HEV predstavlja zoonozu. Iako se oboljenje kod ljudi uglavnom manifestuje samoograničavajućim akutnim hepatitisom, sa niskom stopom letaliteta, kod imunokompromitovanih osoba se može razviti hronični tok bolesti, pri čemu su najugroženije trudnice, posebno u drugom tromesečju trudnoće, kod kojih je veoma zabrinjavajući procenat smrtnih ishoda. Takođe, zabeleženi su slučajevi kod kojih je HEV uslovio patološke promene na bubrezima i nervnom sistemu humane populacije.

Danas postoji mnogo publikacija širom sveta koje su vezane za ovaj virus, njegovu ulogu kao uzročnika zoonoze i svinja kao potencijalno glavnog rezervoara u prirodi. Zahvaljujući dosadašnjim istraživanjima i rezultatima proisteklih iz njih, dobijeno je mnogo informacija o HEV-u, izvorima zaraze i putevima prenošenja. Glavne rezervoare ovog virusa u prirodi predstavljaju domaće i divlje svinje, koje su u najvećem procentu asimptomatske, mada postoje istraživanja u kojima se navodi da je nakon ciljane infekcije ovim patogenom došlo do pojave kliničkih simptoma. Dalje širenje virusa među životinjama moguće je i kod jedinki koje nisu ispoljile simptome, a period tokom koga je širenje virusa moguće značajno varira. Osim toga, moguć je i prenos virusa sa krmače na prasiće dojenjem. Zaražene svinje mogu dospeti na klanicu, a budući da ne pokazuju vidljive simptome bolesti tokom *ante mortem* veterinarskog pregleda, upućuju se na klanje. Ciljni organ ovog virusa predstavlja jetra. Ipak, on se može pronaći i u drugim organima kao što su limfni čvorovi, bubrezi, pa čak i u mišićnom tkivu, odnosno mesu. Međutim, još uvek postoje pitanja o HEV-u koja zahtevaju još odgovora, te je i nastavak opsežnih istraživanja neophodan, kako bi se dobila kompletna slika i shvatila uloge ovog virusa kroz lanac hrane. Identifikacija virusa uz pomoć savremenih molekularno-bioloških metoda ukazala je da kontaminirana hrana iz jedne države može daljim distribuiranjem izazvati pojavu bolesti bilo gde u svetu. Rizik od oboljevanja ljudi dodatno je povećan činjenicom da otkrivanje prisustva ovog virusa još uvek nije uključeno u obavezni plan monitoringa.

Srbija je jedna od zemalja u kojoj je objavljen veoma mali broj istraživanja povezanih sa HEV-om. Prisustvo ovog virusa kod životinja i ljudi, svi njegovi prirodni izvori i mogućnost potencijalne infekcije ljudi ovim uzročnikom putem hrane neka su od pitanja na koja još uvek nema kompletnog odgovora. Našim istraživanjem napravili smo korak napred i pružili odgovore na neka od važnih pitanja vezana za HEV na teritoriji Republike Srbije. Otkrivanjem prisustva, identifikacijom i genotipizacijom HEV-a u jetrama svinja na klanici i u maloprodaji, kao i na površinama i opremi koji dolaze u kontakt sa ovim virusom, primenom molekularno-bioloških tehnika, nastojali smo da doprinesemo uvidu o rasprostranjenosti i distribuciji ovog patogena na teritoriji naše zemlje. Dokazivanjem HEV-a u jetrama svinja koje se koriste u ishrani ljudi na tržištu Republike Srbije omogućen je detaljan uvid o zastupljenosti virusa, mogućnost infekcije ljudi ovim patogenom preko kontaminirane hrane kao i mogućnost prenosa virusa putem opreme. Takođe, rezultati ispitivanja stepena opterećenja tkiva jetre HEV-om mogli bi se koristiti za krajnje donošenje procene potencijalnog rizika po zdravlje potrošača ovim patogenim virusom.

Rezultati ovog istraživanja mogli bi podstaći još veći interes za ispitivanje HEV-a u različitim proizvodima od mesa svinja, otkriće tačne infektivne doze, kao i razvoj eventualnog plana nacionalnog monitoringa u cilju podizanja nivoa jednog zdravlja (One health).

Obrazloženja dobijenih rezultata istraživanja prikazana su po celinama, u skladu sa redosledom postavljenih ciljeva istraživanja.

6.1. Prisustvo i zastupljenost HEV-a

Rezultati našeg istraživanja pokazali su da prevalencija HEV-a kod uzoraka jetri poreklom od svinja sa klanica iznosi 29%. Dobijeni rezultati odgovaraju do sada postojećoj HEV prevalenciji među publikovanim radovima (*Leblanc i sar., 2010; Berto i sar., 2012; Spancerniene i sar., 2019*). Ukoliko napravimo paralelu sa rezultatima istraživanja među zemljama koje nas okružuju, može se videti da je u Mađarskoj ukupna prevalencija kod svinja iznosila 31 % (*Forgach i sar., 2010*).

Uzorci poreklom iz klanice dalje su stratifikovani prema okrugu iz kog potiču, kao i starosti svinja od kojih su poreklom uzorci. Naše istraživanje obuhvatalo je dve starosne kategorije svinja na klanicama: starije od 6 meseci i mlađe od 3 meseca. Iako najveći broj zaklanih svinja (tovljenika) pripada starosnoj kategoriji > 6 meseci, razlog zbog kog smo odlučili da ispitujemo uzorke jetri od svinja mlađih od 3 meseca jesto to što se u Srbiji tradicionalno u većoj meri konzumira meso ove starosne kategorije. Takođe, zna se da prasadi do 2 meseca starosti mogu biti zaštićena pasivnim imunitetom putem mleka, a da su nakon tog perioda veoma osetljivi i veoma lako mogu biti inficirani različitim patogenim mikroorganizmima (*Casas i sar., 2009*). *Monini i saradnici* (2015) u svojim istraživanjima dolaze do zaključka da postoji šansa da krmače mogu imati ulogu u prenosu HEV-a na prasadi nakon što istekne period pasivne zaštite mladunaca. Potvrdu ove hipoteze predstavljali su rezultati našeg prethodnog istraživanja kojima je dokazano prisustvo RNK poreklom od HEV-a samo kod kategorije svinja mlađih od 3 meseca (*Milojević i sar., 2019*).

Uzorkovanje za naše istraživanje trajalo je godinu dana i tokom ovog perioda prikupljeno je 300 uzoraka poreklom od jetri svinja starijih od 6 meseci. Prisustvo HEV-a nije utvrđeno kod ove starosne kategorije. Kada uporedimo naše rezultate sa već objavljenim, možemo uočiti da se rezultati naših istraživanja slažu sa rezultatima prethodno objavljenim od strane *Lupulović D.* (2013) u kojima, takođe, nije utvrđeno prisustvo HEV-a u uzorcima jetre poreklom od tovljenika u našoj zemlji. Slične rezultate prevalencije kod ove starosne kategorije u Sloveniji, prezentovala je grupa istraživača na čelu sa *Lainšček* (2017), gde je prevalencija HEV kod te starosne kategorije iznosila

0,25%. Analizirajući rezultate istraživanja širom Evrope, za ovu starosnu kategoriju, mogu se uočiti različiti nivoi prevalencije koji su se uglavnom kretali od 0% do 10%. **Kantala** (2017) u rezultatima svojih istraživanja, takođe, nije utvrdila prisustvo HEV-a u ovoj starosnoj kategoriji. Prema dostupnim podacima, prevalencija kod svinja starijih od 6 meseci na teritoriji Francuske iznosila je 2,8% prema **Feurer i saradnicima** (2018). Sličan procenat pozitivnih rezultata dobijen je i u Nemačkoj (4,0%) zahvaljujući istraživanju **Wenzel i saradnika** (2011). Zemlje poput Češke, Holandije, Velike Britanije i Španije, takođe, imaju sličnu prevalenciju za ovu starosnu kategoriju 5%, 6,5%, 3% i 6% (*Di Bartolo i sar., 2015; Bouwknegt i sar., 2007; Berto i sar., 2012; Casas i sar., 2011*).

Za razliku od prethodne starosne grupe, naši rezultati pokazali su da je u uzorcima jetri svinja mlađih od 3 meseca, ukupna prevalencija HEV-a iznosila 44%. Dobijeni rezultati u ovom istraživanju ukazuju na veći procenat pozitivnih uzoraka u odnosu na rezultate našeg prethodnog istraživanja, prema kom je on iznosio 34% (*Milojević i sar., 2019*). Na osnovu rezultata prema **Lupulović D.** (2013) ustanovljena prevalencija kod ove starosne kategorije iznosila je 16%. Ukoliko posmatramo rezultate naučnih istraživanja zemalja u regionu, možemo ustanoviti da je u susednoj Mađarskoj prevalencija kod ove starosne kategorije bila 36% prema **Forgach i saradnicima** (2010). Prema **Ruggeri i saradnicima** (2013) prevalencija u Italiji iznosila je 30%. Za razliku od ovih rezultata, u Sloveniji je prevalencija za kategoriju prasadi bila nešto niža i iznosila je 12,1 % (**Lainšček i sar., 2017**). Oscilacije prevalencije u dobijenim rezultatima navedenih istraživanja možemo obrazložiti različitim vremenskim intervalima tokom kojih su sprovedena ispitivanja. Tokom prethodnog istraživanja naše grupe, gde je ustanovljena prevalencija HEV-a bila u nešto nižem procentu, bio je obuhvaćen samo jedan deo godine. Ovim istraživanjem obuhvaćen je jednogodišnji period koji je uključivao vremenske intervale koji su obuhvatili sva godišnja doba i pretpostavljene sezonske razlike u prevalenciji HEV-a.

Takođe, neka od navedenih istraživanja obuhvataju samo jedan geografski deo (region), a na osnovu naših, ali i drugih rezultata (*Jemeršić i sar., DeSabati i sar., 2019*), može se zaključiti da prevalencija nije distribuirana homogeno, već ona varira između ispitivanih regiona jedne zemlje, tako da ispitivanje prevalencije na ograničenom delu teritorije nije pouzdan pokazatelj prevalencije na teritoriji cele zemlje.

Visok procenat pozitivnih životinja na prisustvo HEV-a u kategoriji mlađoj od 3 meseca može se povezati sa činjenicom da je najveći procenat prasadi koja se uvoze u našu zemlju, starosti oko 2 meseca. Kako se zna da u periodu od oko 2 meseca starosti kod prasadi nestaje pasivan imunitet, ovo predstavlja najrizičniji period za infekciju HEV-om. Pored toga, većina farmi u Srbiji nisu farme intenzivnog tipa uzgoja. Na ovakvim farmama, gde su uglavnom prisutne različite starosne kategorije svinja, postoji takođe, u ne malom broju slučajeva i nizak nivo biosigurnosnih mera, pri čemu je omogućenim kontaktom između različitih starosnih kategorija ostvariv i prenos virusa. Transmisija virusa između različitih kategorija svinja na ovim farmama moguća je i preko zaposlenih radnika, koji uglavnom nemaju adekvatnu podelu poslova, već su zaduženi za podmirivanje potreba kod svih starosnih kategorija životinja, te samom cirkulacijom među različitim kategorijama takođe mogu eventualno prenositi i sam virus. Životinje izložene virusom u ovom životnom dobu, postepeno stiču imunitet, te je do vremena planiranog klanja tovljenika (oko 6 meseci starosti) nivo antitela kod životinja u najvećem procentu dovoljno visok da spreči ponovnu infekciju ovim patogenim mikroorganizmom. Budući da veliki procenat tovljenika ima prisutna anti-HEV antitela u periodu klanja, ovo je moguć razlog HEV-negativnih rezultata u našem istraživanju kod ove starosne kategorije (> 6 meseci). Potvrdu ove hipoteze predstavljaju rezultati **Lupulović D.** (2013), prema kojima je seroprevalencija, utvrđena primenom komercijalnog ELISA testa, kod tovljenika sa 3 farme u našoj zemlji iznosila 73,33% i ukazuje na reakciju organizma na prisustvo ovog virusa. Za razliku od naše, u razvijenim zemljama Evropske Unije (EU), posledično su i uslovi uzgoja, sa znatno većim brojem svinja, na višem, naprednijem nivou. Takođe, u ovim zemljama farme su uglavnom intenzivnog

tipa, sa visokim nivoom biosigurnosnih mera koje se primenjuju. Na takvim farmama, znatno manji broj prasadi biva zaražen nakon prestanka pasivnog imuniteta. Nasuprot tome, kod ovakvih farmi veća je verovatnoća da određen broj svinja bude zaražen tokom kasnijih faza tova ovim uzročnikom bolesti. Nisu isključene ni reinfekcije i koinfekcije sa nekim drugim virusom (**Widen, 2016; Salines i sar., 2017**). Sve ovo predstavlja moguće razloge koji su doveli do veće prevalencije HEV-a kod starije kategorije svinja u razvijenijim zemljama EU u odnosu na dobijene rezultate našeg istraživanja.

Jedan od propratnih podataka koji je svaki uzorak korišćen za naše ispitivanje morao imati, između ostalog, bila je i informacija o polu životinje. Na osnovu analize dobijenih podataka pokušali smo da utvrdimo potencijalnu povezanost pola sa prevalencijom HEV-a kod svinja na klanicama. Obradom dobijenih podataka utvrđeno je da pol ne utiče na procenat inficiranosti životinja HEV-om. U literaturi nije dostupan veliki broj publikacija u kojima se ispituje veza između pola životinje i prisustva HEV-a. Potvrdu da pol nema uticaja na seroprevalenciju dobili smo u dosadašnjim publikovanim rezultatima **Temmam i saradnika (2013)**.

Uzorci ispitani tokom realizacije ove doktorske disertacije prikupljeni su sa teritorije tri okruga u našoj zemlji (Šumadijski, Kolubarski i Sremski). Sam odabir okruga zasnovan je na njihovom geografskom položaju, kao i mogućnosti postojećih klanica iz ovih okruga da ispune unapred definisane zadatke našeg istraživanja, među kojima je zahtev da ispitivani uzorci obuhvataju bar dve starosne kategorije svinja. Nakon dobijanja rezultata prisustva HEV-a u jetrama svinja na klanicama, njihovom daljom obradom ispitali smo teritorijalnu distribuciju virusa. Ustanovljeno je da između rezultata dobijenih iz tri okruga postoje statistički značajne razlike ($p < 0,001$). Približno isti rezultati značajnosti između analiziranih okruga dobijeni su kako kod ukupnog broj uzoraka, tako i kod uzoraka jetri svinja mlađih od 3 meseca.

Šumadijski okrug bio je region u kome je ustanovljen najmanji broj pozitivnih nalaza HEV-a u ispitivanim uzorcima jetre svinja. Analizom rezultata, bez obzira na starost svinja, ukupna prevalencija iznosila je 4,67%. Nasuprot tome, kada se analiziraju rezultati za svinje mlađe od 3 meseca, prevalencija je iznosila 7%. Nasuprot njemu, Sremski okrug je, prema dobijenim podacima, region u kome je HEV veoma rasprostranjen među populacijom svinja. Tako je prevalencija na osnovu svih ispitanih uzoraka iz klanica u ovom okrugu 49%, dok je kod kategorije mlađe od 3 meseca prevalencija bila značajno veća, sa 73,5 % pozitivnih nalaza. Između ova dva ekstrema, nalazi se Kolubarski okrug, sa prevalencijama od 33,33% i 50% u zavisnosti da li posmatramo ukupan broj uzoraka, ili samo uzorke poreklom od svinja mlađih od 3 meseca. Ovako različit procenat pozitivnih nalaza HEV-a između okruga ne predstavlja nikakvo iznenađenje, nasuprot tome, potpuno je moglo bi se reći i očekivan. Ukoliko uporedimo prevalencije HEV-a između različitih zemalja širom Evrope, možemo videti da je i unutar njih utvrđena i različita prevalencija. Budući da je našim istraživanjem obuhvaćena daleko manja teritorijalna površina, razlike u prevalenciji između različitih oblasti, ukazuju nam da postoji različita dinamika prenosa i nivoa izlaganja ovom virusu u ispitivanim oblastima. Takođe, još neki od razloga koji mogu da imaju uticaj na ovakve razlike su i varijacije u broju svinja na ovim teritorijama, kao i načina gajenja svinja na njima (ekstenzivan ili intezivan). Budući da je Sremski okrug region koji ima dugu tradiciju uzgoja svinja i u poređenju sa preostala dva regiona ima najveću populaciju svinja, pretpostavlja se da su to mogući uzroci visoke prevalencije HEV-a. Za razliku od prethodnog, Šumadijski region ima najmanju populaciju svinja među tri ispitivana okruga (Republički zavod za statistiku, 2018, www.stat.gov.rs). Varijacije u procentu pozitivnih rezultata prema geografskoj distribuciji na teritoriji jedne zemlje u svojim rezultatima publikovali su i **Jemeršić i saradnici (2017)**. U njihovim istraživanjima, u uzorcima poreklom od divljih svinja zabeležene su varijacije prevalencije HEV-a po regionima. Takođe, u Italiji su zabeležene varijacije kod pozitivnih rezultata prisustva ovog virusa kod divljih svinja između dva ispitivana regiona (**DeSabati i sar., 2019**).

Kako bi se ispitao uticaj sezonskih godišnjih doba na pojavu ispitivanog patogenog uzročnika, uzorci su prikupljeni u različitim vremenskim intervalima tokom jedne godine. Kao što je već navedeno, ovaj godišnji period podeljen je na 4 sezonska kvartala (zima, proleće, leto i jesen). Analizirajući dobijene podatke došlo smo do zaključka da pojava HEV oscilira tokom godine, to jest da postoji u određenom stepenu sezonski uticaj u pojavi ovog patogenog mikroorganizma. U ovom istraživanju zabeleženo je da su zimska i letnja sezona periodi godini tokom kojih dolazi do inteziviranja pojave prisusutva ovog virusa. Tako je u našem istraživanju procenat pozitivnih tokom zime bio 32,89% posmatrajući ukupne uzorke, to jest 49,33% ukoliko su analizom obuhvaćeni uzorci od kategorije svinja mlađih od 3 meseca. U letnjem periodu ispitivanja bilo je 37,33% pozitivnih, odnosno 56% zavisno od toga da li su uključene sve starosne kategorije svinja, ili samo mlađe od 3 meseca. Za razliku od zime i leta, tokom prolećne i jesenje sezone zabeležena je niža prevalencija (proleće 22,67% i jesen 23,11%) ukoliko analiziramo uzorke obe starosne kategorije svinja. Ukoliko se razmara starosna kategorija do 3 meseca, razlike u procentualoj zastupljenosti pozitivnih uzoraka između letnje i zimske u odnosu na prolećnu i jesenju bile su još izraženije. Tokom proleća prevalencija je bila 34%, dok je u jesenjoj sezoni ona iznosila 34,67%.

Prema postojećim podacima iz literature, pored malog broj publikacija o ovoj temi vezano za pojavu HEV-a kod svinja, u mnogo većoj meri zastupljeni su naučni radovi gde je sezonski efekat opisan u humanoj populaciji, naročito za zemlje Azije. Na osnovu rezultata istraživanja brojnih autora, smatra se da postoji sezonska pojava kod ovog patogena i da se ona povezuje sa uslovima životne sredine, kao i vremenskim nepogodama. Tako je veći broj slučajeva u Indiji, Nepal i Pakistanu zabeležen tokom poplava za vreme monsuna (**Khuroo i sar., 2016**). Prema istraživanju **Zhu i saradnika** (2014), u Kini, najveći broj akutnih slučajeva hepatitisa kod ljudi uzrokovanih HEV-om, javio se u toku zimskog perioda (hladnog vremena). Za razliku od njih, rezultati istraživanja u jugozapadnoj Engleskoj ukazuju da je najveći broj slučajeva ustanovljen tokom proleća i leta, ali razlog ovakve sezonske pojave nije u potpunosti obrazložen (**Dalton i sar., 2008**). Nasuprot tome, prema istraživanju iz Francuske kojim su obuhvaćeni slučajevi oboljenja ljudi tokom perioda dužeg od 5 godina, sezonski uticaj na pojavu nije utvrđen (**Mansuy i sar., 2009**).

Dostupnih podataka o uticaju godišnjih doba na pojavu HEV-a kod svinja je veoma malo. Pregledom literature ustanovljeno je da je podatke o sezonskoj pojavi HEV-a kod domaćih svinja detaljno opisala jedna istraživačka grupa na čelu sa **Lu** (2013). U njihovom istraživanju, dolaze do zaključka da je sezonski uticaj utvrđen, pri čemu su se javljali pikovi u periodima mart-april i septembar-oktobar. Druga grupa istraživača koja je istraživala ovu pojavu bila je iz Španije i tema njihovog istraživanja bila je mogućnost pojave sezonske prevalencije HEV-a kod divljih svinja u ovoj zemlji (**Rivero-Juarez i sar., 2018**). Ova grupa naučnika došla je takođe do zaključka da postoji sezonski uticaj, kao i da je najveća prevalencija HEV-a kod divljih svinja u periodu kasne jeseni. Rezultati do kojih smo mi došli, takođe, potvrđuju sezonsku pojavu ovog patogena. Naši rezultati, kao i rezultati istraživača iz Kine, ukazuju da postoje dva pika učestalosti infekcije prouzrokovane HEV-om kod domaćih svinja tokom godine. Za razliku od prethodno navedenih istraživanja, prema našim rezultatima ti pikovi su u periodima zime i leta. Razlike u vremenu pojave pikova delimično možemo objasniti različitim grupisanjem vremenskih intervala. Budući da su pikovi istraživača iz Kine bili u mesecima koji su prema našoj stratifikaciji predstavljali mesece na kraju i početku različitih sezona. Ipak, kako u našoj zemlji najveći procenat predstavljaju farme ekstenzivnog tipa, naše rezultate mogli bi i povezati sa spoljašnjom temperaturom i učestalijim bliskijim kontaktima među svinjama za vreme ovih perioda. Sezone kod kojih je došlo do porasta procenta pozitivnih nalaza predstavljaju sezone u kojima spoljašnja temperatura najviše oscilira. Budući da je u zimskom periodu spoljašnja temperatura najniža, veća je šansa da dođe do intezivnijeg kontakta među svinjama zbog hladnoće. Nasuprot tome, letnji period je sezona sa najvišom spoljašnjom temperaturom, tako da je svinjama uglavnom potrebno da se rashlade. Najčešći način rashlađivanja svinja je valjanjem u vlažnoj i mokroj sredini (često i u sopstvenim izlučevinama). Takođe, tokom ovog perioda postoje farme koji svinje drže u „ispustima”. Ispusti predstavljaju ograđene površine većih ili manjih

dimenzija u kojima dolazi do istovremenog držanja različitih starosnih kategorija, tako da je kontakt između njih intezivniji. Kako se zna da je prenos ovog virusa fekalno-oralnim putem, učestaliji kontakt među svinjama, pogotovo različitih starosnih kategorija dovodi i do intezivnijeg širenja virusa među populacijom svinja. Ipak, kako bi se potvrdile naše pretpostavke i doneo konačan zaključak o mogućem uticaju sezonskih godišnjih doba na pojavu ovog virusa kod svinja u našoj zemlji, neohodno je nastaviti sa intezivnim istraživanjima, koja bi doprinela prikupljanju i obradi što više podataka na ovu temu.

Daljom obradom naših rezultata u pravcu analiziranja teritorijalne distribucije HEV-a po sezonama, pokušali smo da istražimo moguću povezanost između regiona, a na osnovu sezona. Dobijeni podaci potvrdili su da je Šumadijski okrug region u kom je tokom svih kvartala utvrđena značajno niža prevalencija HEV-a u odnosu na druga dva okruga, osim tokom proleća, gde su Šumadijski i Kolubarski okrug predstavljali regione sa značajno nižom prevalencijom u odnosu na Sremski. Sezonska pojava u okruzima zabeležena je u Kolubarskom i Šumadijskom okrugu. Posmatrajući samo Sremski okrug po sezonama, nije bilo moguće potvrditi sezonalnost do koje smo došli na osnovu analize svih uzoraka po sezonama. Budući da je ovo okrug u kome je zabeležena veoma visoka prevalencija HEV-a tokom celokupnog trajanja istraživanja, ovako visok procenat pozitivnih svinja može imati uticaj na izostanak uticaja godišnjeg doba na pojavu virusa u ovom okrugu.

Prilikom stratifikacije uzoraka prema izvoru iz kog potiču, izdvojena je zasebna grupa uzoraka jetri koji su bili poreklom iz maloprodaje. Rezultatima dobijenim za ovu grupu uzoraka, utvrdili smo da je 5%, od 60 ispitanih uzoraka, bilo pozitivno na prisustvo virusa hepatitisa E. Statističkom obradom rezultata na osnovu sezone tokom koje su uzorci prikupljeni, nisu ustanovljene statistički značajne razlike među ispitivanim sezonama. Prevalencija HEV-a kod jetri poreklom iz maloprodaje, do koje smo došli tokom istraživanja, ne razlikuje se u odnosu na već ranije publikovane naučne podatke. Tako su **Bouwknegt i saradnici** (2007) objavili da je 6,5% ispitanih uzoraka jetre svinja iz prodajnih objekata u Holandiji bilo pozitivno na prisustvo ovog virusa. Takođe, prema istraživanju u Nemačkoj, 4% ispitivanih uzoraka jetri iz maloprodaja bilo je pozitivno (**Wenzel i sar., 2011**). Prema **Pallerla i saradnicima** (2020), u Nemačkoj je 10% testiranih uzoraka (proizvodi od jetre i proizvodi od mesa svinja) bilo pozitivno na HEV, dok je u Švajcarskoj prevalencija HEV-a bila na nivou od 18,9% u kobasicama koje sadrže tkivo jetre (**Moor i sar., 2018**). Grupa istraživača na čelu sa **Di Bartolo** (2015) u svom istraživanju, kod kobasica koje sadrže tkivo jetre i prikupljenih iz prodavnica prehrambenih proizvoda u Italiji, dokazala je prisustvo HEV-a. Prevalencija kod svežih kobasica koje u sebi sadrže tkivo jetre iznosila je 22,2%, dok je u sušenim kobasicama iznosila 4,3%. Prema publikovanim podacima od strane **Boxman i saradnika** (2020), u Holandiji je procenat HEV pozitivnih uzoraka među kobasicama spremnim za konzumiranje iznosio 14,6%. Pozitivni nalazi prisustva HEV-a među uzorcima koji su namenjeni direktno za potrošače ukazuju na potencijalnu opasnost, posebno za osetljive kategorije stanovništva. Daljim istraživanjima trebalo bi ustanoviti infektivnu dozu HEV-a, sa krajnjim ciljem dobijanja definitivnih odgovora o analizi rizika infekcijom HEV-a putem kontaminirane hrane.

Rezultati naših istraživanja ukazuju nam i da HEV može predstavljati potencijalni rizik u lancu proizvodnje hrane animalnog porekla, a koji se odnosi na prisustvo HEV-a na površinama i opremi koje dolaze u kontakt sa hranom. Među prikupljenih i ispitanih 60 briseva sa površina iz tri klanice iz različitih okruga u našoj zemlji, HEV je dokazan kod 22% ispitivanih uzoraka. Daljom analizom podataka nije utvrđena statistička značajna razlika u pojavi HEV-a u odnosu na sezonski period tokom kojeg su uzorci prikupljeni. Nasuprot tome, analizom uzoraka briseva sa linije klanja na osnovu okruga iz kog potiču brisevi (Šumadijski, Kolubarski i Sremski), ustanovljene su statističke značajne razlike među ispitivanim okruzima. U Šumadijskom okrugu nije utvrđeno prisustvo HEV u uzorcima briseva sa površina na liniji klanja, dok je u Sremskom okrugu utvrđen najveći procenat pozitivnih uzoraka (50%). Analizirajući nivoe statističke značajnosti procenata HEV pozitivnih

uzoraka površina, primećujemo da je ona bila značajna između Šumadijskog i Sremskog okruga i iznosila $p < 0,001$, zatim Kolubarskog i Sremskog okruga $p < 0,05$, dok između Šumadijskog i Kolubarskog nije ustanovljena signifikantna razlika ($p > 0,05$). Dobijeni rezultati pokazuju da postoji direktna korelacija između pojave pozitivnih uzoraka sa površine i pozitivnih uzoraka jetri. Tako je u Sremskom okrugu, gde je procentualno najveći procenat HEV pozitivnih svinja, ustanovljen i najveći procenat pozitivnih briseva sa površina i opreme u klanici. Za razliku od toga, u Šumadijskom okrugu procenat pozitivnih svinja je najniži, pa stoga posledično nije utvrđeno ni prisustvo HEV-a u uzorcima sa površina. Osim prethodno navedenog, postoji još jedan od bitnih razloga koji može imati važnu ulogu u pojavi HEV-a na površinama i opremi u klanici, a to je obučenosť i edukacija radnika u cilju striktno implementacije procedura dobre higijenske i proizvođačke prakse (*GHP-Good Hygienic Practices, GMP-Good Manufacturing Practices, eng.*), kao i integrisanog i HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*) sistema tokom celokupne proizvodnje. Primena odgovarajućih mera, u okviru pomenutih integrisanih sistema kontrole u proizvodnji hrane animalnog porekla, podrazumeva, između ostalog, i da temperatura u sterilizatorima za noževe koji se koriste tokom rada treba da bude adekvatna (82°C), posebno u delu za klanje i evisceraciju. Takođe, posebnu pažnju treba obratiti na proces evisceracije kako ne bi došlo do pucanja žučne kese i dalje potencijalne kontaminacije trupa na liniji klanja. Potrebno je zatim voditi računa da prilikom pranja i dezinfekcije opreme koriste se i adekvatna dezinfekciona sredva, koja bi posedovala pored baktericidnog, dodatno i virucidno dejstvo. Budući da nije moguće detektovati HEV pozitivne svinje na ulasku u klanicu, jer ne pokazuju kliničke simptome infekcije tokom *ante-mortem* pregleda. Obavezno sprovođenje propisanih adekvatnih mera, kao i edukacija i obuke radnika predstavljaju najvažniju kariku u lancu sprečavanja dalje kontaminacije ovim virusom u lancu proizvodnje svinjskog mesa.

6.2. Genetička identifikacija i filogenetska analiza dobijenih izolata HEV-a

Sekvenciranje delova genoma HEV urađeno je u cilju tačne taksonomske klasifikacije subgenotipova, utvrđivanja međusobne srodnosti sekvenci iz uzoraka, kao i konfirmacije HEV sekvenci dobijenih u našem istraživanju. Utvrđen je stepen sličnosti u nukleotidnom sastavu između naših sekvenci iz uzoraka sa sekvencama HEV-a dostupnim u „GenBank“ - bazi podataka. Za potrebe karakterizacije i genotipizacije dobijenih izolata HEV-a izvršeno je sekvenciranje dela genoma virusa u oblasti ORF2. ORF 2 deo izabran je na osnovu stava mreže evropskih referentnih laboratorija za ispitivanje HEV-a (HEVNet, <https://www.rivm.nl/en/hevnet>), koja je tokom 2020. godine definisala ORF2e-2f region genoma HEV-a kao deo koji je najmanje podložan mutacijama i kao takav predstavlja najidealniji deo za sekvenciranje i dalju filogenetsku analizu. U našem istraživanju ukupno 56 izolata pripremljeno je i sekvencirano metodom po Sangeru. Nakon sekvenciranja, obradom dobijenih elektroferograma, za dalju analizu su zadržane nukleotidne sekvence ukupno 52 izolata HEV-a, dok su 4 sekvence odbačene zbog lošeg kvaliteta elektroferograma. Ovako obrađene kompletne sekvence su u cilju identifikacije dalje analizirane upotrebom BLAST programa, a konsenzus sekvence su upoređene sa sekvencama odgovarajućeg ORF2 regiona genoma već poznatih sekvenci iz baze podataka. Filogenetskom analizom dokazali smo prisustvo 4 klastera među našim dobijenim izolatima. Klaster I obuhvatao je najveću grupu (43) sekvenci HEV-a koji pripadaju genotipu HEV-3 i subgenotipu 3a. Subgenotip 3a detektovan je u zemljama koje nas okružuju, kao i u zemljama regiona. Mađarska, Hrvatska, Slovenija i Rumunija neke su od zemlja u kojima je ovaj subgenotip dominantan u populaciji svinja (*Forgách i sar., 2010; Prpić i sar., 2015; Lainšček i sar., 2017; Porea i sar., 2017*). Na osnovu objavljenih rezultata različitih grupa istraživača, može se zaključiti da je u ovom delu Evrope najrasprostranjeniji subgenotip HEV-3a. Ovo su takođe potvrdili i rezultati dobijeni tokom naših istraživanja. Takođe, prisustvo ovog subgenotipa opisano je i kod istraživanja poreklom iz Nemačke, Italije, Francuske, Holandije i drugih evropskih zemalja. Pored toga, ovaj subgenotip zabeležen je i kod populacija svinja u Japanu i SAD.

Daljim ispitivanjem matrice genetičkih distanci između izolata virusa HEV-3a dobijenih analizom sekvenci ORF2 regiona utvrđeno je da se genetička udaljenost između njih kretala u intervalu od 0% do 13,1%, dok je prosečna bila 6,5%. Sekvence su imale visok procenat sličnosti sa postojećom sekvencom AF082843, izolovanom od strane **Meng i saradnika** (1997) u Americi. Analizirajući dobijene rezultate ustanovili smo da postoji značajna genetička udaljenost između pojedinih sekvenci dobijenih iz uzoraka koji su bili uzorkovani u istoj sezoni, ali različitog geografskog porekla. Tako je zabeležena genetička udaljenost veća od 10% između Šumadijskog i Kolubarskog (143SH-114K; 143SH-173K; 143SH-169K), kao i Sremskog u odnosu na Kolubarski (27S-40K; 27S-48K). Takođe, značajna genetička udaljenost sekvenci zabeležena je i između pojedinih sekvenci dobijenih iz uzoraka sa istog geografskog područja, ali tokom različite sezone uzorkovanja (169K-114K; 173K-114K; 12K-169K; 17S-110S; 17S-173; 95K-114K). Nalaz ovakve genetičke udaljenosti među sekvencama ukazuje nam da postoje klasteri HEV virusa koji su specifični za određenu geografsku teritoriju, a verovatno i za pojedinačne farme. Za razliku od toga, kod velikog broja sekvenci dobijenih iz uzoraka zabeležena je veoma mala genetička udaljenost između uzoraka poreklom iz različitih okruga (115SH-114S; 121SH-114S; 135SH-124K; 185S-160SH; 45S-10SH). Na osnovu visokog procenta sličnosti između sekvenci poreklom sa različitih geografskih područja, zaključili smo da postoji konstantna povezanost i komunikacija između okruga na osnovu kojih je omogućena teritorijalna transmisija virusa. Da li razlog ovome predstavlja trgovina svinjama između ovih regiona, ili postoji neki drugi način prenosa virusa, do adekvatnog odgovora jedino možemo doći sa nastavkom opsežnih ispitivanja na ovu temu.

Klasterom II obuhvaćena su 2 sekvence HEV-a iz našeg istraživanja. Ove sekvence pripadaju subgenotipu 3c koji se genetički izrazito malo (< 5%) razlikuju od referentnog soja FJ705359. Subgenotip 3c rasprostranjen je u zemljama centralne Evrope, a zemlje kao što su Nemačka i Holandija predstavljaju područja u kojima se ovaj subgenotip smatra za najrasprostranjeniji (**Pallerla i sar., 2020; Boxman i sar., 2020**). Kako se najveći broj prasadi i nazimica u Srbiju uvozi iz ovih zemalja (**Evropska komisija, 2013**), naša hipoteza je da su ovi pojedinačni nalazi 3c subgenotipa HEV-a posledice transmisije virusa preko pozitivno uveženih jedinki iz ovih država.

Treća grupa sekvenci dobijenih iz uzoraka iz našeg ispitivanja svrstana je u Klaster III. Ova grupa obuhvatala je 6 sekvenci HEV-a, subgenotipa 2a, koji su najbliži referentnom soju M74506. Ispitivanjem matrice genetičkih distanci između ovih sekvenci utvrđeno je da je između svih 6 sekvenci genetička udaljenost skoro 0%, dok se u odnosu na referentni izolat razlikuju veoma malo – od 2,8 do 5,2%. Međutim, genotip HEV-2 karakterističan je za humanu populaciju, prenosi se uglavnom preko vode i najčešće je zabeležen u zemljama Afrike i Meksiku (**Kaiser i sar., 2017**). Nalaz ovog genotipa do sada nije zabeležen kod životinja, stoga naše sekvence predstavljaju prve HEV-a subgenotipa 2a poreklom iz uzoraka jetri svinja. Međutim, mi ističemo da u je ovoj studiji korišćena DNK polimeraza bez 3'-5' egzozonukleazne aktivnosti, te je prilikom polimerizacije moglo da dođe do vezivanja pogrešnih nukleotida, rezultirajući generisanjem pogrešnog sastava oligonukleotidnog lanca. Rezultati naših istraživanja i nalaz subgenotipa HEV-2a kod životinja otvaraju potpuno novu temu vezanu za HEV, a potreban je nastavak istraživanja kako bi se dobili odgovori kojima bi se potvrdilo ili opovrglo naš dobijeni rezultat.

Klaster IV obuhvatio je samo jednu sekvencu dobijenu iz uzorka iz našeg istraživanja, za koji filogenetskom analizom nije bilo moguće svrstavanje u određeni subgenotip. Radi se o uzorku SRB-HEV-25SH-2020|HEV-3, za koji se sa verovatnoćom od 88% može potvrditi pripadanost genotipu HEV-3, a ispitivanjem genetičke udaljenosti utvrđeno je da je ova sekvenca najbliža klasterima HEV-3c, HEV-3h i HEV-3i. Naša hipoteza je da ovaj izolat, kao i izolati klastera II, vodi poreklo od svinja uvezenih u Srbiju iz zemalja centralne Evrope, u kojima egzistiraju ovi subgenotipovi HEV-a.

6.3. Kvantifikacija pozitivnih HEV uzoraka iz tkiva jetri

Na osnovu dobijenih rezultata kvantifikacije pozitivnih uzoraka, tkivo jetre u proseku bilo je opterećeno sa $4,41 \log_{10} (2,5 \times 10^4)$ HEV genomskih kopija po gramu tkiva. Broj genomskih kopija po gramu tokom istraživanja kretao se u intervalu od 1,0 do $9,16 \log_{10}$. Analizirajući do sada publikovane naučne radove širom Evrope, može se zaključiti da rezultati broja genomskih kopija po gramu tkiva jetre nisu apsolutno podudarni. Prema **Feurer i saradnicima** (2018), u Francuskoj broj genomskih kopija po gramu tkiva jetre kretao se od $7,8 \times 10^3$ do $1,46 \times 10^8$, sa prosečnom vrednosti od $1,3 \times 10^5$. Grupa istraživača na čelu sa **Boxman** (2019) publikovala je rezultate u kojima se interval broja genomskih kopija HEV po gramu u tkivu jetre kretao od $2,1 \times 10^2$ do $1,2 \times 10^6$, dok je prosečna vrednost iznosila $3,4 \times 10^5$. Prema ovom istraživanju, kod proizvoda koji u sebi primarno sadrže tkivo jetre, ustanovljen je broj kopija od 3×10^4 i 7×10^4 , zavisno od grupe proizvoda. Takođe, u Holandiji kod uzoraka kobasica spremnih za konzumiranje, a poreklom iz supermarketa, prosečan broj genomskih kopija u 5 grama uzorka iznosio je $2,76 \log_{10}$ (**Boxman i sar.**, 2020). Budući da u kobasicama procentaulna zastupljenost tkiva jetre uglavnom ne prelazi 50 %, dobijene niže vrednosti broja HEV-a za ovu vrstu uzoraka potpuno su očekivane. Takođe, kobasice prolaze neki od procesa termičke obrade ili bar određeni proces zrenja. Svi ovi procesi imaju negativan uticaj na preživljavanje HEV-a u finalnom proizvodu.

Ukoliko analizu broja genomskih kopija HEV-a proširimo i na uzorke jetri koji su poreklom od divljih svinja, situacija je još alarmantnija. Tako je u Češkoj prosečna vrednost iznosila $1,86 \times 10^7$ prema **Kubankovoj i saradnicima** (2015), a u Nemačkoj $2,26 \times 10^7$ (**Anheyer-Behmenburg i sar.**, 2017). Nešto niže vrednosti zabeležene su u centralnoj Italiji, gde je prosečna vrednost broja genomskih kopija po gramu iznosila $1,85 \times 10^4$ (**Di Pasquale i sar.**, 2019). Za razliku od ove grupe istraživača, **De Sabato i saradnici** (2019) publikuju istraživanje u kom su predstavili rezultate po kojima je srednja vrednost genomskih kopija po gramu u tkivu jetre bila $1,4 \times 10^7$, dok je u mišićima ova vrednost iznosila $1,4 \times 10^5$.

U našem istraživanju, analizom dobijenih podataka o broju kopija na osnovu geografskog porekla uzoraka, došli smo do rezultata prema kojima je medijana najvećeg broja kopija/g bila u Sremskom okrugu. Medijana je iznosila 4,30 i statistički bilo je značajno ($p < 0,01$) viša u odnosu na preostala dva ispitivana okruga. Kako je Sremski okrug region u kome je prevalencija HEV-a bila najviša, a budući da je više od 50% (56,32%) ukupnog broja pozitivnih uzoraka poticalo iz ovog regiona, dobijeni rezultati su bili donekle i očekivani. Rezultati statističke obrade podataka po sezonama pokazali su da je medijana najvećeg broja kopija/g bila u Sremskom okrugu tokom sva četiri ispitivana kvartala. U ovom okrugu, tokom sezona, medijana se kretala u intervalu od 4,24 do $4,86 \log_{10}$ kopija/g. Najveće oscilacije medijane tokom sezona zabeležene su u Šumadijskom okrugu ($2,04$ - $3,79 \log_{10}$ kopija/g), sa izuzetkom letnje sezone u kojoj nije bilo pozitivnih uzoraka u ovom okrugu.

Za razliku od toga, kada smo analizirali ukupan broj pozitivnih uzoraka prema sezonama, došli smo do rezultata da je medijana najnižeg broja \log_{10} kopija/g bila tokom leta (3,87). Tokom zime medijana je iznosila $3,93 \log_{10}$ kopija/g. U odnosu na njih, tokom proleća i zime vrednosti medijane bile su više (4,18 i $4,01 \log_{10}$ kopija/g). Nisu ustanovljene statističke značajnosti među ispitivanim sezonama u broju genomskih kopija po gramu.

Kako se procenjuje da je oralna infektivna doza HEV-a za ljude preko $10^{5,5}$ genomskih kopija po gramu HEV-a RNK (**ANSES**, 2009), rezultati naših istraživanja potvrdili su stav da postoji opravdani rizik za prenos HEV-a sa svinja na ljude preko konzumiranja proizvoda od mesa koji sadrže sirovu ili termički nedovoljno tretiranu svinjsku jetru.

Koncept jednog zdravlja (*One Health*, eng) definisan je kao kolaborativni, multisektorski i transdisciplinarni pristup kojim je obuhvaćen rad na lokalnom, regionalnom, nacionalnom i globalnom nivou, a sa ciljem postizanja optimalnih zdravstvenih rezultata prepoznajući međusobnu povezanost ljudi, životinja, biljaka i njihovog zajedničkog okruženja. Ovaj pristup pokazao se veoma efikasnim načinom borbe protiv zdravstvenih problema, uključujući i zarazne bolesti, na globalnom nivou. U cilju jačanja jednog zdravlja, smatramo da bi dobijeni rezultati iz ove doktorske disertacije mogli da utiču na podizanje kapaciteta za razvoj ostalih molekularno-bioloških metoda dijagnostikovanja virusa u hrani, kao i na razvijanje i sprovođenje plana monitoringa ovog virusa, kako kod svinja, tako i u humanoj populaciji.

7. ZAKLJUČCI

Na osnovu sprovedenih istraživanja i dobijenih rezultata iz istih, kao i podataka iz aktuelne literature, može se zaključiti sledeće:

1. Ekstrakcija i detekcija virusne RNK urađena je optimizovanom metodologijom, kojom je postignuto smanjenje procenta lažno negativnih rezultata.
2. Potvrđena je različita geografska distribucija HEV-a u jetrama svinja na klanicama. Najveći procenat pozitivnih uzoraka utvrđen je u Sremskom okrugu (49% kod ukupnog broja uzoraka i 73,5% kod uzoraka prasadi mlađih od 3 meseca).
3. Nije ustanovljena statistički značajana razlika u broju pozitivnih uzoraka kod životinja različitog pola.
4. Ustanovljena je sezonska učestalost nalaza HEV-a u jetrama svinja. Tokom godine utvrđena su dva pika u prevalenciji, koja se javljaju tokom zimske i letnje sezone. Statistički značajno niži procenat pozitivnih uzoraka zabeležen je tokom prolećne i jesenje sezone.
5. Prisustvo HEV-a ustanovljeno je kod 22% uzoraka briseva sa površina i opreme na liniji klanja. Najveći broj pozitivnih nalaza (50%) bio je Sremskom okrugu.
6. Analizom uzoraka jetri iz maloprodajnih objekata, HEV je potvrđen kod 3 uzorka od ukupno 60 ispitanih na prisustvo ovog virusa (5%).
7. Rezultati filogenetske analize pokazali su da postoji visok stepen sličnosti između nukleotidnih sekvenci dobijenih iz uzoraka u ovom istraživanju i onih već opisanih u svetu. Od 52 ispitanih sekvenci dobijenih iz uzoraka, 43 (82,7%) je pripadalo subgenotipu HEV-3a, pri čemu je prosečna genetička udaljenost između njih bila 6,5%. Dve sekvence (3%) pripadale su subgenotipu HEV-3c, njih šest (11,5%) svrstane su u HEV-2a, dok je jedna sekvenca (1,9%) pripadala genotipu 3, pri čemu nije bilo moguće precizno odrediti njen subgenotip (najsljedniji je bio HEV-3c, HEV-3h i HEV-3i).
8. Rezultati kvantifikacije pozitivnih uzoraka pokazali su da je tkivo jetre u proseku bilo opterećeno sa 4,41 log₁₀ (2,5×10⁴) genomskih kopija HEV po gramu tkiva. Broj genomskih kopija po gramu se tokom celokupnog perioda istraživanja kretao u intervalu od 1,0 do 9,16 log₁₀.
9. Statističkom obradom dobijenih podataka o broju genomskih kopija po gramu, a na osnovu geografskog porekla uzoraka, utvrđeno je da je medijana najvećeg broja genomskih kopija

po gramu bila u Sremskom okrugu ($4,30 \log_{10}$) i statistički je bila značajno ($p < 0,01$) viša u odnosu na preostala dva ispitivana okruga.

10. Dobijeni rezultati istraživanja ukazuju da je potrebno uspostaviti plan monitoringa prisustva HEV-a, kako kod životinja, tako i kod ljudi, u cilju podizanja nivoa bezbednosti jednog zdravlja (One Health, eng.).

8. SPISAK LITERATURE

1. Aggarwal, R. & S. Jameel (2011): *Hepatitis E. Hepatology*, 54(6), 2218-2226, doi:10.1002/hep.24674.
2. Aggarwal, R., Kini, D., Sofat, S., Naik, S. R. & Krawczynski, K. (2000). *Duration of viraemia and faecal viral excretion in acute hepatitis E. The Lancet*, 356(9235), 1081–1082. doi:10.1016/s0140-6736(00)02737-9.
3. Aheyer-Behmenburg, H. E., Szabo, K., Schotte, U., Binder, A., Klein, G. & Johne, R. (2017). *Hepatitis E virus in wild boars and spillover infection in red and roe deer, Germany, 2013–2015. Emerging Infectious Diseases*, 23(1), 130–133. doi:10.3201/eid2301.161169.
4. Aniță, A., Gorgan, L., Aniță, D., Oșlobanu, L., Pavio, N. & Savuța, G. (2014). *Evidence of hepatitis E infection in swine and humans in the East Region of Romania. International Journal of Infectious Diseases*, 29, 232–237. doi:10.1016/j.ijid.2014.10.018.
5. ANSES, French Agency for food, environmental and occupational health and safety. Avis de l'Agence française de sécurité sanitaire des aliments [cited 2009 Sept 23]. <https://www.anses.fr/fr/system/files/MIC2009sa0146.pdf>
6. Arankalle, V. A., Ticehurst, J., Sreenivasan, M. A., Kapikian, A. Z., Popper, H., Pavri, K. M. & Purcell, R. H. (1988). *Aetiological association of a virus-like particle with enterically transmitted non-a, non-b hepatitis. The Lancet*, 331(8585), 550–554. doi:10.1016/s0140-6736(88)91351-7.
7. Arankalle, V. A., Tsarev, S. A., Chadha, M. S., Alling, D. W., Emerson, S. U., Banerjee, K., & Purcell, R. H. (1995). *Age-specific prevalence of antibodies to hepatitis A and E viruses in Pune, India, 1982 and 1992. Journal of Infectious Diseases*, 171(2), 447–450. doi:10.1093/infdis/171.2.447.
8. Asimoula, S., Elena, T., Alexopoulos, C., Kyriakis, S. C. & Froesner, G. (2009). *First report of serological evidence of hepatitis E virus infection in swine in northern Greece. Acta Veterinaria*, 59(2-3), 205–211. doi:10.2298/avb0903205s.
9. Balayan, M. S., Andjaparidze, A. G., Savinskaya, S. S., Ketiladze, E., Braginsky, D. M., Savinov, A. P. & Poleschuk, V. F. (1983). *Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. Intervirology*, 20(1), 23–31. doi:10.1159/000149370.
10. Barnaud, E., Rogée, S., Garry, P., Rose, N. & Pavio, N. (2012). *Thermal inactivation of infectious hepatitis E virus in experimentally contaminated food. Appl Environ Microbiol*, 78, 5153–5139.
11. Batts, W., Yun, S., Hedrick, R. & Winton, J. (2011). *A novel member of the family Hepeviridae from cutthroat trout (Oncorhynchus clarkii). Virus Research*, 158(1-2), 116–123. doi:10.1016/j.virusres.2011.03.019.
12. Baylis, S. A., Blümel, J., Mizusawa, S., Matsubayashi, K., Sakata, H., Okada, Y., Nubling, C. & Hanschmann, K (2013). *World Health Organization International Standard to Harmonize Assays for Detection of Hepatitis E Virus RNA. Emerging Infectious Diseases*, 19(5), 729–735. doi:10.3201/eid1905.121845.
13. Belabbes, E.-H., Bouguermouh, A., Benatallah, A. & Illoul, G. (1985). *Epidemic non-A, non-B viral hepatitis in Algeria: Strong evidence for its spreading by water. Journal of Medical Virology*, 16(3), 257–263. doi:10.1002/jmv.1890160306.
14. Berto, A., Backer, J. A., Mesquita, J. R., Nascimento, M. S., Banks, M., Martelli, F., Ostanelli, F., Angeloni, G., Di Bartolo, I., Ruggeri, F., Vasickova, P., Diez-Valcarce, M., Hernandez, M., Rodriguez-Lazaro, D. & van der Poel, W. H. (2012). *Prevalence and transmission of hepatitis E virus in domestic swine populations in different European countries. BMC Research Notes*, 5(1). doi:10.1186/1756-0500-5-190
15. Berto, A., Mesquita, J. R., Hakze-van der Honing, R., Nascimento, M. S. J., & van der Poel, W. H. M. (2012). *Detection and characterization of hepatitis E virus in domestic pigs of different*

- ages in Portugal. *Zoonoses and Public Health*, 59(7), 477–481. doi:10.1111/j.1863-2378.2012.01488.x.
16. Berto, A., Van der Poel, W. H. M., Hakze-van der Honing, R., Martelli, F., La Ragione, R. M., Inglese, N., Collins, J., Grierson, S., Johne, R., Reetz, J., Dastjerdi, A. & Banks, M. (2013). *Replication of hepatitis E virus in three-dimensional cell culture*. *Journal of Virological Methods*, 187(2), 327–332. doi:10.1016/j.jviromet.2012.10.017
17. Birke, L., Cormier, S. A., You, D., Stout, R. W., Clement, C., Johnson, M. & Thompson, H. (2014) *Hepatitis E antibodies in laboratory rabbits from 2 US vendors*. *Emerg Infect Dis* 20:693–696.
18. Boland, F., Martinez, A., Pomeroy, L. & O'Flaherty, N. (2019). *Blood donor screening for hepatitis E virus in the European Union*. *Transfusion Medicine and Hemotherapy*, 46(2), 95–103. doi:10.1159/000499121.
19. Bouamra, Y., Gérolami, R., Arzouni, J.-P., Grimaud, J.-C., Lafforgue, P., Nelli, M., Tivoli, N., Ferretti, A., Motte, A. & Colson, P. (2014). *Emergence of autochthonous infections with hepatitis E virus of genotype 4 in Europe*. *Intervirology*, 57(1), 43–48. doi:10.1159/000354801.
20. Bouwknegt, M., Engel, B., Herremans, M. M. P. T., Widdowson, M. A., Worm, H. C., Koopmans, M. P. G., ... Van Der Poel, W. H. M. (2007). *Bayesian estimation of hepatitis E virus seroprevalence for populations with different exposure levels to swine in The Netherlands*. *Epidemiology and Infection*, 136(4), 567–576. doi:10.1017/s0950268807008941.
21. Bouwknegt, M., Lodder-Verschoor, F., Van Der Poel, W. H. M., Rutjes, S. A., & De Roda Husman, A. M. (2007). *Hepatitis E virus RNA in commercial porcine livers in the Netherlands*. *Journal of Food Protection*, 70(12), 2889–2895. doi:10.4315/0362-028x-70.12.2889.
22. Bouwknegt, M., Rutjes, S. A., Reusken, C. B. E. M., Stockhofe-Zurwieden, N., Frankena, K., de Jong, M. C. M., de Roda Husman, A. & van der Poel, W. H. M. (2009). *The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation*. *BMC Veterinary Research*, 5(1), 7. doi:10.1186/1746-6148-5-7.
23. Boxman, I. L. A., Jansen, C. C. C., Zwartkruis-Nahuis, A. J. T., Hägele, G., Sosef, N. P., & Dirks, R. A. M. (2020). *Detection and quantification of hepatitis E virus RNA in ready to eat raw pork sausages in the Netherlands*. *International Journal of Food Microbiology*, 333, 108791. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108791.
24. Brassard, J., Gagné, M.-J., Généreux, M., & Côté, C. (2012). *Detection of human food-borne and zoonotic viruses on Irrigated, Field-Grown Strawberries*. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(10), 3763–3766. doi:10.1128/aem.00251-12.
25. Breum, S. Ø., Hjulsgaard, C. K., de Deus, N., Segalés, J. & Larsen, L. E. (2010). *Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population*. *Veterinary Microbiology*, 146(1-2), 144–149. doi:10.1016/j.vetmic.2010.05.002.
26. Burri, C., Vial, F., Ryser-Degiorgis, M.-P., Schwermer, H., Darling, K., Reist, M., Wu, N., Beerli, O., Schoning, J., Cavassini, M. & Waldvogel, A. (2014). *Seroprevalence of hepatitis E virus in domestic pigs and wild boars in Switzerland*. *Zoonoses and Public Health*, n/a–n/a. doi:10.1111/zph.12103.
27. Burt, S. A., Veltman, J., Hakze-van der Honing, R., Schmitt, H. & van der Poel, W. H. (2016) *Hepatitis E virus in farmed rabbits, wild rabbits and petting farm rabbits in the Netherlands*. *Food Environ Virol* 8:227–229.
28. Capai, L., Charrel, R., & Falchi, A. (2018). *Hepatitis E in high-income countries: What do we know? And what are the knowledge gaps?* *Viruses*, 10(6), 285. doi:10.3390/v10060285.
29. Caruso, C., Peletto, S., Rosamilia, A., Modesto, P., Chiavacci, L., Sona, B., Balsamelli, F., Ghisetti, V., Acutis, P. L., Pezzoni, G., Brocchi, E., Vitale, N. & Masoero, L. (2016). *Hepatitis E virus: A cross-sectional serological and virological study in pigs and humans at zoonotic risk within a high-density pig farming area*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 64(5), 1443–1453. doi:10.1111/tbed.12533.

30. Casas, M., Cortés, R., Pina, S., Peralta, B., Allepuz, A., Cortey, M., Casal, J. & Martín, M. (2011). *Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-finish swine herds*. *Veterinary Microbiology*, 148(1), 27–34. doi:10.1016/j.vetmic.2010.08.010
31. Casas, M., Pujols, J., Rosell, R., de Deus, N., Peralta, B., Pina, S., Casal, J. & Martín, M. (2009). *Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain*. *Veterinary Microbiology*, 135(3-4), 248–252. doi:10.1016/j.vetmic.2008.09.075.
32. Chandler, J. D., Riddell, M. A., Li, F., Love, R. J., & Anderson, D. A. (1999). *Serological evidence for swine hepatitis E virus infection in Australian pig herds*. *Veterinary Microbiology*, 68(1-2), 95–105. doi:10.1016/s0378-1135(99)00065-6.
33. Chandra, V., Taneja, S., Kalia, M., & Jameel, S. (2008). *Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus*. *Journal of Biosciences*, 33(4), 451–464. doi:10.1007/s12038-008-0064-1.
34. Chaussade, H., Rigaud, E., Allix, A., Carpentier, A., Touzé, A., Delzescaux, D., Choutet, P., Garsia-Bonett, N. & Coursaget, P. (2013). *Hepatitis E virus seroprevalence and risk factors for individuals in working contact with animals*. *Journal of Clinical Virology*, 58(3), 504–508. doi:10.1016/j.jcv.2013.08.030.
35. Choo, Q., Kuo, G., Weiner, A., Overby, L., Bradley, D., & Houghton, M. (1989). *Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome*. *Science*, 244(4902), 359–362. doi:10.1126/science.2523562.
36. Clayson, E. T., Bruce, L., Myint, K. S. A., Narupiti, S., Vaughn, D. W., Giri, S., Ranabhat, P. & Innis, B. L. (1995). *Detection of hepatitis E virus infections among domestic swine in the Kathmandu valley of Nepal*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 53(3), 228–232. doi:10.4269/ajtmh.1995.53.228.
37. Costanzo N, Sarno E, Peretti V, Ciambrone L, Casalnuovo F. & Santoro, A. (2015). *Serological and molecular investigation of swine hepatitis E virus in pigs raised in Southern Italy*. *Journal of Food Protection*, 78(11), 2099–2102. doi:10.4315/0362-028x.jfp-15-159.
38. Cui, W., Sun, Y., Xu, A., Gao, R., Gong, L., Zhang, L., & Jiang, M. (2016). *Hepatitis E seroprevalence and related risk factors among seafood processing workers: a cross-sectional survey in Shandong Province, China*. *International Journal of Infectious Diseases*, 49, 62–66. doi:10.1016/j.ijid.2016.05.028.
39. Dalton H. R., G. W. Webb, B. C. Norton, K. L. Woolson (2016): *Hepatitis E virus: Time to change the textbooks*. *Dig Dis*, 34(4), 308-316, doi:10.1159/000444468.
40. Dalton, H. R., Stableforth, W., Thurairajah, P., Hazeldine, S., Remnarace, R., Usama, W., Farrington, L., Hamad, N., Sieberhagen, C., Ellis, V., Mitchell, J., Hussaini, S. H., Banks, M., Ijaz, S. & Bendall, R. P. (2008). *Autochthonous hepatitis E in Southwest England: natural history, complications and seasonal variation, and hepatitis E virus IgG seroprevalence in blood donors, the elderly and patients with chronic liver disease*. *European Journal of Gastroenterology & Hepatology*, 20(8), 784–790. doi:10.1097/meg.0b013e3282f5195a.
41. De Sabato, L., Amoroso, M.G., Ianiro, G., Esposito, C., De Grossi, L., Fusco, G., Barone, A., Martini, E., Ostanello, F. & Bartolo, I. (2019). *Detection of hepatitis E virus in livers and muscle tissues of wild boars in Italy*. *Food Environ Virol* 12, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s12560-019-09405-0>.
42. De Sabato, L., Ostanello, F., De Grossi, L., Marcario, A., Franzetti, B., Monini, M., & Di Bartolo, I. (2018). *Molecular survey of HEV infection in wild boar population in Italy*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(6), 1749–1756. doi:10.1111/tbed.12948.
43. Di Bartolo, I., Diez-Valcarce, M., Vasickova, P., Kralik, P., Hernandez, M., Angeloni, G., Ostanello, F., Bouwknecht, M., Rodriguez-Lazaro, D., Pavlik, I. & Ruggeri, F. M. (2012). *Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010*. *Emerging Infectious Diseases*, 18(8). doi:10.3201/eid1808.111783.
44. Di Bartolo, I., G. Angeloni, E. Ponterio, F. Ostanello, F. & Rugger, M. (2015): *Detection of hepatitis E virus in pork liver sausages*. *Int J Food Microbiol*, 193, 29-33, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2014.10.005.

45. Di Martino, B., Di Profio, F., Melegari, I., Sarchese, V., Robetto, S., Marsilio, F. & Martella, V. (2016). *Detection of hepatitis E virus (HEV) in goats*. *Virus Research*, 225, 69–72. doi:10.1016/j.virusres.2016.09.008.
46. Di Pasquale, S., De Santis, P., La Rosa, G., Di Domenico, K., Iaconelli, M., Micarelli, G., Martini, E., Bilei, S., De Medici, D. & Suffredini, E. (2019). *Quantification and genetic diversity of hepatitis E virus in wild boar (Sus scrofa) hunted for domestic consumption in Central Italy*. *Food Microbiology*, 82, 194–201. doi:10.1016/j.fm.2019.02.005.
47. Doceul, V., E. Bagdassarian, A. Demange, N. Pavio (2016): *Zoonotic hepatitis E virus: Classification, animal reservoirs and transmission routes*. *Viruses*, 8 (10), doi:10.3390/v8100270.
48. Drebber, U., Odenthal, M., Aberle, S. W., Winkel, N., Wedemeyer, I., Hemberger, J., Holzmann, H. & Dienes, H.-P. (2013). *Hepatitis E in liver biopsies from patients with acute hepatitis of clinically unexplained origin*. *Frontiers in Physiology*, 4. doi:10.3389/fphys.2013.00351.
49. Dreier, J., Knabbe, C., & Vollmer, T. (2018). *Transfusion-transmitted hepatitis E: NAT screening of blood donations and infectious dose*. *Frontiers in Medicine*, 5. doi:10.3389/fmed.2018.00005.
50. ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), (2017). *Hepatitis E in the EU/EEA, 2005-2015*. Stockholm. June 2017, doi: 10.2900/059144.
51. European Commission (2013). *Market data on national and European agriculture, provided by the European Commission's agricultural and rural development department*. Retrieved March 20, 2019. <https://agridata.ec.europa.eu/extensions/DashboardPigmeat/PigmeatTradeAnalysis.html>.
52. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) (2015): *The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014*. *EFSA Journal* 13(12), 19.
53. EFSA: *Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen* (2017), from <https://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/4886>.
54. Faber, M. S., Wenzel, J. J., Jilg, W., Thamm, M., Höhle, M., & Stark, K. (2012). *Hepatitis E virus seroprevalence among adults, Germany*. *Emerging Infectious Diseases*, 18(10), 1654–1657. doi:10.3201/eid1810.111756.
55. Fernández-Barredo S, Galiana C, García A, Gomez-Muñoz MT, Vega S, Rodríguez-Iglesias MA, Pérez-Gracia MT (2007). *Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs*. *Can J Vet Res* 71:236–240.
56. Fernandez-Barredo, S, C. Galiana, A. Garcia, S. Vega, M.T. Gomez, M.T. Perez-Gracia (2006). *Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction*. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 18, 462-465.
57. Feurer, C., Le Roux, A., Rossel, R., Barnaud, E., Dumarest, M., Garry, P., et al. (2018). *High load of hepatitis E viral RNA in pork livers but absence in pork muscle at French slaughterhouses*. *Int J Food Microbiol*, 264, 25-30, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2017.10.013.
58. Forgach, P., Nowotny, N., Erdelyi, K., Boncz, A., Zentai, J., Szucs, G., et al. (2010). *Detection of hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary*. *Vet Microbiol*, 143(2-4), 106-116, doi:10.1016/j.vetmic.2009.11.004.
59. García-Bocanegra, I., Rivero, A., Caballero-Gómez, J., López-López, P., Cano-Terriza, D., Frías, M., Jimenez-Ruiz, S., Risalde, M., Gomes-Villamandos, J. & Rivero-Juarez, A. (2018). *Hepatitis E virus infection in equines in Spain*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 66(1), 66–71. doi:10.1111/tbed.12962.
60. Grierson, S., Heaney, J., Cheney, T., Morgan, D., Wyllie, S., Powell, L., Smith, D., Ijaz, S., Steinbach, F., Choudhury, B. & Tedder, R. S. (2015). *Prevalence of hepatitis E virus infection in pigs at the time of slaughter, United Kingdom, 2013*. *Emerging Infectious Diseases*, 21(8), 1396–1401. doi:10.3201/eid2108.141995.
61. Guillois, Y., Abravanel, F., Miura, T., Pavio, N., Vaillant, V., Lhomme, S., Guyader, F., Rose, N., Saux, J., King, L., Izopet, J. & Couturier, E. (2015). *High proportion of asymptomatic infections in an outbreak of hepatitis E associated with a spit-roasted piglet, France, 2013*. *Clinical Infectious Diseases*, 62(3), 351–357. doi:10.1093/cid/civ862.

62. Hakze-van der Honing, R. W., van Coillie, E., Antonis, A. F. G., & van der Poel, W. H. M. (2011). *First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium*. PLoS ONE, 6(8), e22673. doi:10.1371/journal.pone.0022673.
63. Haqshenas, G., Read, D. H., Woolcock, P. R., Shivaprasad, H. L., & Meng, X. J. (2001). *Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis–splenomegaly syndrome in the United States*. Journal of General Virology, 82(10), 2449–2462. doi:10.1099/0022-1317-82-10-2449.
64. Hartl, J., Otto, B., Madden, R., Webb, G., Woolson, K., Kriston, L., Vettorazzi, E., Lohse, A., Dalton, H. & Pischke, S. (2016). *Hepatitis E seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis*. Viruses, 8(8), 211. doi:10.3390/v8080211.
65. He, J., Innis, B. L., Shrestha, M. P., Clayson, E. T., Scott, R. M., Linthicum, K. J., Musser, G. G., Gigliotti S. C., Binn, L. N., Kuschner, R. A. & Vaughn, D. W. (2006). *Evidence that rodents are a reservoir of hepatitis E virus for humans in Nepal*. Journal of Clinical Microbiology, 44(3), 1208–1208. doi:10.1128/jcm.44.3.1208.2006.
66. Herremans, M., Vennema, H., Bakker, J., van der Veer, B., Duizer, E., Benne, C. A., Waar, K., Hendriks, B., Schneeberger, P., Blaauw, G., Kooiman, M. & Koopmans, M. P. G. (2007). *Swine-like hepatitis E viruses are a cause of unexplained hepatitis in the Netherlands*. Journal of Viral Hepatitis, 14(2), 140–146. doi:10.1111/j.1365-2893.2006.00786.x.
67. Huang, F., Li, Y., Yu, W., Jing, S., Wang, J., Long, F., He, Z., Yang, C., Bi, Y., Cao, W., Liu, C., Hua, X. & Pan, Q. (2016). *Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis*. Hepatology, 64(2), 350–359. doi:10.1002/hep.28668.
68. International Organization for Standardization. 2018. Microbiology of food chain-horizontal methods for surface sampling. ISO 18593:2018.
69. International Organization for Standardization. 2019. Microbiology of food and animal feed-horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR-part1: method for quantification. ISO/TS 15216-2:2019.
70. Ivanova, A., Tefanova, V., Reshetnjak, I., Kuznetsova, T., Geller, J., Lundkvist, Å., Janson, M., Neare, K., Velstrom, K., Jokelainen, P., Lassen, B., Hutt, P., Saar, T., Viltrop, A. & Golovljova, I. (2015). *Hepatitis E virus in domestic pigs, wild boars, pig farm workers, and hunters in Estonia*. Food and Environmental Virology, 7(4), 403–412. doi:10.1007/s12560-015-9210-8.
71. Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, Lhomme S, Marchandeanu S, Boucher S, Kamar N, Abravanel F, Guerin JL (2012). *Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France*. Emerg Infect Dis 18:1274–1281.
72. Jemeršić, L., Keros, T., Maltar, L., Barbić, L., Vilibić Čavlek, T., Jeličić, P., Rode, O. & Prpić, J. (2017). *Differences in hepatitis E virus (HEV) presence in naturally infected seropositive domestic pigs and wild boars - an indication of wild boars having an important role in HEV epidemiology*. Veterinarski Arhiv, 87(6), 651–663. doi:10.24099/vet.arhiv.170208.
73. Jiménez de Oya, N., de Blas, I., Blázquez, A.-B., Martín-Acebes, M. A., Halaihel, N., Gironés, O., Saiz, J. & Escribano-Romero, E. (2011). *Widespread distribution of hepatitis E virus in Spanish pig herds*. BMC Research Notes, 4(1). doi:10.1186/1756-0500-4-412.
74. Johne, R., E. Trojnar, M. Filter, J. Hofmann (2016): *Thermal stability of hepatitis E virus as estimated by a cell culture method*. Appl Environ Microbiol, 82(14), 4225-4231, doi:10.1128/aem.00951-16.
75. Johne, R., Plenge-Bonig, A., Hess, M., Ulrich, R. G., Reetz, J., & Schielke, A. (2009). *Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR*. Journal of General Virology, 91(3), 750–758. doi:10.1099/vir.0.016584-0.
76. Jori, F., Laval, M., Maestrini, O., Casabianca, F., Charrier, F., & Pavio, N. (2016). *Assessment of domestic pigs, wild boars and feral hybrid pigs as reservoirs of hepatitis E virus in Corsica, France*. Viruses, 8(8), 236. doi:10.3390/v8080236.
77. Jothikumar, N., T. L. Cromeans, B. H. Robertson, X. J. Meng and V. R. Hill (2006): *A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus*. J Virol Methods, 131(1), 65–71. doi:10.1016/j.jviromet.2005.07.004.

78. Kaiser, M., Kamili, S., Hayden, T., Blümel, J., & Baylis, S. A. (2017). *Genome sequence of a genotype 2 hepatitis E virus World Health Organization reference strain*. *Genome Announcements*, 5(7). doi:10.1128/genomea.01664-16.
79. Kamar N., R. Bendall, F. Legrand-Abbravanel, N. S. Xia, S. Ijaz, J. Izopet and H. R. Dalton (2012): *Hepatitis E*. *Lancet*, 379, 2477–2488.
80. Kamar, N., Garrouste, C., Haagsma, E. B., Garrigue, V., Pischke, S., Chauvet, C. i sar. (2011). *Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis E virus infection Who Have Received Solid Organ Transplants*. *Gastroenterology*, 140(5), 1481–1489. doi:10.1053/j.gastro.2011.02.050.
81. Kanai, Y., Tsujikawa, M., Yunoki, M., Nishiyama, S., Ikuta, K., & Hagiwara, K. (2010). *Long-term shedding of hepatitis E virus in the feces of pigs infected naturally, born to sows with and without maternal antibodies*. *Journal of Medical Virology*, 82(1), 69–76. doi:10.1002/jmv.21647.
82. Kane, M. A. (1984). *Epidemic non-A, non-B hepatitis in Nepal*. *JAMA*, 252(22), 3140. doi:10.1001/jama.1984.03350220046029.
83. Kantala, T. *Presence of hepatitis E virus (HEV) and markers for HEV infection in production swine, human patients with unexplained hepatitis, and veterinarians in Finland*. University of Helsinki; 2017. <http://hdl.handle.net/10138/178897>.
84. Kantala, T., Heinonen, M., Oristo, S., von Bonsdorff, C.-H., & Maunula, L. (2015). *Hepatitis E virus in young pigs in Finland and characterization of the isolated partial genomic sequences of genotype 3 HEV*. *Foodborne Pathogens and Disease*, 12(3), 253–260. doi:10.1089/fpd.2014.1841.
85. Kenney, S. P., & Meng, X.-J. (2019). *Hepatitis E virus: animal models and zoonosis*. *Annual Review of Animal Biosciences*, 7(1), 427–448. doi:10.1146/annurev-animal-020518-115117.
86. Khuroo, M. M., Duermeyer, W., Zargar, S. A., Ahanger, M. A., & Shah, M. A. (1983). *Acute sporadic non-a, non-b hepatitis in india*. *Am. J. Epidemiol*, 118(3), 360–364. doi:10.1093/oxfordjournals.aje.a113643.
87. Khuroo, M. S. (1980). *Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis*. *Am. J. Med*, 68(6), 818–824. doi:10.1016/0002-9343(80)90200-4.
88. Khuroo, M. S., & Khuroo, M. S. (2015). *Hepatitis E: an emerging global disease - from discovery towards control and cure*. *Journal of Viral Hepatitis*, 23(2), 68–79. doi:10.1111/jvh.12445.
89. Khuroo, M., Khuroo, M., & Khuroo, N. (2016). *Transmission of hepatitis E virus in developing countries*. *Viruses*, 8(9), 253. doi:10.3390/v8090253.
90. Kokkinos, P., Kozyra, I., Lazic, S., Bouwknegt, M., Rutjes, S., Willems, K., Moloney, R., Roda Husman, A., Kaupke, A., Legaki, E., D'Agostino, M., Cook, N., Rzezutka, A., Petrovic, T. & Vantarakis, A. (2012). *Harmonised investigation of the occurrence of human enteric viruses in the leafy green vegetable supply chain in three European Countries*. *Food and Environmental Virology*, 4(4), 179–191. doi:10.1007/s12560-012-9087-8.
91. Krog, J. S., Larsen, L. E., & Breum, S. Ø. (2019). *Tracing hepatitis E virus in pigs from birth to slaughter*. *Frontiers in Veterinary Science*, 6. doi:10.3389/fvets.2019.00050.
92. Krumbholz, A., Joel, S., Dremsek, P., Neubert, A., Johne, R., Dürrwald, R. i sar (2014). *Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany*. *Medical Microbiology and Immunology*, 203(4), 273–282. doi:10.1007/s00430-014-0336-3.
93. Krumbholz, A., Mohn, U., Lange, J., Motz, M., Wenzel, J. J., Jilg, W., Walther, M., Straube, E., Wutzler, P. & Zell, R. (2012). *Prevalence of hepatitis E virus-specific antibodies in humans with occupational exposure to pigs*. *Medical Microbiology and Immunology*, 201(2), 239–244. doi:10.1007/s00430-011-0210-5.
94. Kubankova, M., Kralik, P., Lamka, J., Zakovcik, V., Dolanský, M., & Vasickova, P. (2015). *Prevalence of hepatitis E virus in populations of wild animals in comparison with animals bred in game enclosures*. *Food and Environmental Virology*, 7(2), 159–163. doi:10.1007/s12560-015-9189-1.
95. Kukielka, D., Rodriguez-Prieto, V., Vicente, J., & Sánchez-Vizcaíno, J. M. (2015). *Constant hepatitis E virus (HEV) circulation in wild boar and red deer in Spain: An Increasing Concern Source*

- of HEV Zoonotic Transmission. *Transboundary and Emerging Diseases*, 63(5), e360–e368. doi:10.1111/tbed.12311.
96. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., & Tamura, K. (2018). *MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms*. *Molecular Biology and Evolution*, 35(6), 1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
97. Kumar, S., Subhadra, S., Singh, B., & Panda, B. K. (2013). *Hepatitis E virus: the current scenario*. *International Journal of Infectious Diseases*, 17(4), e228–e233. doi:10.1016/j.ijid.2012.11.026.
98. Kureljušić, B., *Ispitivanje imunofenotipa mononuklearnog ćelijskog infiltrata u jetri svinja prirodno inficiranih virusom hepatitis E*. Doktorska disertacija, Fakultet veterinarske medicine, Univerzitet u Beogradu; 2012.
99. Lange H, Øverbø J, Borgen K, Dudman S, Hoddevik G, Urdahl AM, Vold L, Sjurseth SK (2016). *Hepatitis E in Norway: seroprevalence in humans and swine*. *Epidemiol Infect* 145:181–186. doi:10.1017/s0950268816002144 .
100. Lapa, D., Capobianchi, M., & Garbuglia, A. (2015). *Epidemiology of hepatitis E virus in European Countries*. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(10), 25711–25743. doi:10.3390/ijms161025711.
101. Leblanc, D., Poitras, E., Gagné, M.-J., Ward, P., & Houde, A. (2010). *Hepatitis E virus load in swine organs and tissues at slaughterhouse determined by real-time RT-PCR*. *International Journal of Food Microbiology*, 139(3), 206–209. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.016.
102. Li, T.-C., Chijiwa, K., Sera, N., Ishibashi, T., Etoh, Y., Shinohara, Y., Kurata, Y., Ishida, M., Sakamoto, S., Takeda, N. & Miyamura, T. (2005). *Hepatitis E virus transmission from wild boar meat*. *Emerging Infectious Diseases*, 11(12), 1958–1960. doi:10.3201/eid1112.051041.
103. Lin, J., Norder, H., Uhlhorn, H., Belak, S., & Widén, F. (2013). *Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose*. *Journal of General Virology*, 95(Pt_3), 557–570. doi:10.1099/vir.0.059238-0.
104. Lipej, Z., Novosel, D., Vojta, L., Roić, B., Šimpraga, M., & Vojta, A. (2013). *Detection and characterisation of hepatitis E virus in naturally infected swine in Croatia*. *Acta Veterinaria Hungarica*, 61(4), 517–528. doi:10.1556/avet.2013.031.
105. Liu, P., Du, R. jie, Wang, L., Han, J., Liu, L., Zhang, Y. lin, Xia, J. ke, Lu, F. Min & Zhuang, H. (2014). *Management of hepatitis E virus (HEV) zoonotic transmission: Protection of rabbits against HEV challenge following immunization with HEV 239 vaccine*. *PLoS ONE*, 9(1), e87600. doi:10.1371/journal.pone.0087600.
106. Lu, L., Li, C., & Hagedorn, C. H. (2005). *Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis*. *Reviews in Medical Virology*, 16(1), 5–36. doi:10.1002/rmv.482.
107. Lu, Y. H., Qian, H. Z., Hu, A. Q., Qin, X., Jiang, Q. W., & Zheng, Y. J. (2013). *Seasonal pattern of hepatitis E virus prevalence in swine in two different geographical areas of China*. *Epidemiology and Infection*, 141(11), 2403–2409. doi:10.1017/s0950268813000113.
108. Lupulovic, D., Lazic, S., Prodanov-Radulovic, J., Jiménez de Oya, N., Escribano-Romero, E., Saiz, J.-C., & Petrovic, T. (2010). *First serological study of hepatitis E virus infection in backyard pigs from Serbia*. *Food and Environmental Virology*, 2(2), 110–113. doi:10.1007/s12560-010-9033-6.
109. Lupulović, D., *Razvoj i primena različitih laboratorijskih metoda za dijagnostikovanje infekcije izazvane hepatitis E virusom kod svinja i ljudi*. Poljoprivredni fakultet, Univerzitet u Novom Sadu; 2013.
110. Machnowska, P., Ellerbroek, L., & Johne, R. (2014). *Detection and characterization of potentially zoonotic viruses in faeces of pigs at slaughter in Germany*. *Veterinary Microbiology*, 168(1), 60–68. doi:10.1016/j.vetmic.2013.10.018.
111. Mansuy, J. M., Abravanel, F., Miedouge, M., Mengelle, C., Merviel, C., Dubois, M., Kamar, N., Rostaing, L., Alric, L., Moreau, J., Peron, J. & Izopet, J. (2009). *Acute hepatitis E in south-west*

- France over a 5-year period. *Journal of Clinical Virology*, 44(1), 74–77. doi:10.1016/j.jcv.2008.09.010.
112. Mansuy, J. M., Gallian, P., Dimeglio, C., Saune, K., Arnaud, C., Pelletier, B., Morel, P., Legrand, D., Tiberghien, P. & Izopet, J. (2016). *A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors*. *Hepatology*, 63(4), 1145–1154. doi:10.1002/hep.28436.
113. Marek, A., Bilic, I., Prokofieva, I., & Hess, M. (2010). *Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising at least three different genotypes*. *Veterinary Microbiology*, 145(1-2), 54–61. doi:10.1016/j.vetmic.2010.03.014.
114. Martelli, F., Caprioli, A., Zengarini, M., Marata, A., Fiegna, C., Di Bartolo, I., Ruggeri, F., Delogu, M. & Ostanello, F. (2008). *Detection of hepatitis E virus (HEV) in a demographic managed wild boar (Sus scrofa scrofa) population in Italy*. *Veterinary Microbiology*, 126(1-3), 74–81. doi:10.1016/j.vetmic.2007.07.004.
115. Mast, E. E., Alter, M. J., Holland, P. V., & Purcell, R. H. (1998). *Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel*. *Hepatology*, 27(3), 857–861. doi:10.1002/hep.510270331.
116. Matsubayashi, K., Kang, J.-H., Sakata, H., Takahashi, K., Shindo, M., Kato, M. i sar. (2008). *A case of transfusion-transmitted hepatitis E caused by blood from a donor infected with hepatitis E virus via zoonotic food-borne route*. *Transfusion*, 48(7), 1368–1375. doi:10.1111/j.1537-2995.2008.01722.x.
117. McElroy, A., Hiraide, R., Bexfield, N., Jalal, H., Brownlie, J., Goodfellow, I., & Caddy, S. L. (2015). *Detection of hepatitis E virus antibodies in dogs in the United Kingdom*. *PLOS ONE*, 10(6), e0128703. doi:10.1371/journal.pone.0128703.
118. Meister, T. L., Bruening, J., Todt, D., & Steinmann, E. (2019). *Cell culture systems for the study of hepatitis E virus*. *Antiviral Research*, 163, 34–49. doi:10.1016/j.antiviral.2019.01.007.
119. Meng X. J., B. Wiseman, F. Elvinger, D. K. Guenette, T. E. Toth, R. E. Engle, S. U. Emerson, R. H. Purcell (2002): *Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries*. *J Clin Microbiol*, 40, 117–22.
120. Meng, X. J. (2010): *Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk*. *Vet Microbiol*, 140(3-4), 256–265, doi:10.1016/j.vetmic.2009.03.017.
121. Meng, X. J., P. G. Halbur, M. S. Shapiro, S. Govindarajan, J. D. Bruna, Mushahwar, I., Purcel, R. & Emerson, S. (1998): *Genetic and experimental evidence for cross-species infection by swine hepatitis E virus*. *J Virol*, 72(12), 9714–9721.
122. Milojević, L., Velebit, B., Teodorović, V., Kirbiš, A., Petrović, T., Karabasil, N., & Dimitrijević, M. (2019). *Screening and molecular characterization of hepatitis E virus in slaughter pigs in Serbia*. *Food and Environmental Virology*, 11(4), 410–419. doi:10.1007/s12560-019-09393-1.
123. Monini, M., Di Bartolo, I., Ianiro, G., Angeloni, G., Magistrali, C. F., Ostanello, F., & Ruggeri, F. M. (2015). *Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds*. *Archives of Virology*, 160(10), 2547–2556. doi:10.1007/s00705-015-2538-4.
124. Montone, A. M. I., De Sabato, L., Suffredini, E., Alise, M., Zaccherini, A., Volzone, P., Di Maro, O., Neola, B., Capuano, F. & Di Bartolo, I. (2019). *Occurrence of HEV-RNA in Italian regional pork and wild boar food products*. *Food and Environmental Virology*, 11(4), 420–426. doi:10.1007/s12560-019-09403-2.
125. Moor, D., Liniger, M., Baumgartner, A., & Felleisen, R. (2018). *Screening of ready-to-eat meat products for hepatitis E virus in Switzerland*. *Food and Environmental Virology*, 10(3), 263–271. doi:10.1007/s12560-018-9340-x.
126. Mrzljak, A., Dinjar-Kujundzic, P., Jemersic, L., Prpic, J., Barbic, L., Savic, V., Stevanovic, V. & Vilibic-Cavlek, T. (2019). *Epidemiology of hepatitis E in South-East Europe in the “One*

- Health” concept.* World Journal of Gastroenterology, 25(25), 3168–3182. doi:10.3748/wjg.v25.i25.3168.
127. Mushahwar, I. K. (2008). *Hepatitis E virus: Molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention.* Journal of Medical Virology, 80(4), 646–658. doi:10.1002/jmv.21116.
128. Myint, H., Soe, M. M., Myint, T. M., Khin, T., & Tin, K. M. (1985). *A Clinical and Epidemiological study of an epidemic of non-A, non-B Hepatitis in Rangoon.* The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 34(6), 1183–1189. doi:10.4269/ajtmh.1985.34.1183.
129. Okamoto, H. (2007). *Genetic variability and evolution of Hepatitis E virus.* Virus Research, 127(2), 216–228. doi:10.1016/j.virusres.2007.02.002.
130. Okamoto, H. (2011). *Hepatitis E virus cell culture models.* Virus Research, 161, 65–77.
131. Okamoto, H. (2012). *Culture systems for hepatitis E virus.* Journal of Gastroenterology, 48(2), 147–158. doi:10.1007/s00535-012-0682-0.
132. Okano, H., Nakano, T., Sugimoto, K., Takahashi, K., Nagashima, S., Takahashi, M., Arai, M. & Okamoto, H. (2013). *High genomic similarity between European type hepatitis E virus subgenotype 3e strains isolated from an acute hepatitis patient and a wild boar in Mie, Japan.* Hepatology Research, 44(6), 694–699. doi:10.1111/hepr.12155.
133. Pallerla, S. R., Schembecker, S., Meyer, C. G., Linh, L. T. K., Johne, R., Wedemeyer, H., Tomas Bock, C., Kremsner, P. & Velavan, T. P. (2020). *Hepatitis E virus genome detection in commercial pork livers and pork meat products in Germany.* Journal of Viral Hepatitis, 28(1), 196–204. doi:10.1111/jvh.13396.
134. Panda, S. K., Thakral, D., & Rehman, S. (2007). *Hepatitis E virus.* Reviews in Medical Virology, 17(3), 151–180. doi:10.1002/rmv.522.
135. Parisi, F., Mazzei, M., Verin, R., Forzan, M., Rocchigiani, G., Roper, C., Bertelloni, G & Poli, A. (2019). *Hepatitis E virus infection in wild rabbit (Oryctolagus cuniculus) in Italy and in the UK: a serological, molecular, and pathological study.* European Journal of Wildlife Research, 65(5). doi:10.1007/s10344-019-1314-2.
136. Park, W. J., B. J. Park, H. S. Ahn, J. B. Lee, S. Y. Park, C. S. Song i sar. (2016): *Hepatitis E virus as an emerging zoonotic pathogen.* J Vet Sci, 17(1), 1-11, doi:10.4142/jvs.2016.17.1.1.
137. Pavio, N., Doceul, V., Bagdassarian, E., & Johne, R. (2017). *Recent knowledge on hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human.* Veterinary Research, 48(1). doi:10.1186/s13567-017-0483-9.
138. Pavio, N., T. Merbah i A. Thebault (2014): *Frequent hepatitis E virus contamination in food containing raw pork liver, France.* Emerg Infect Dis, 20(11), 1925-1927, doi:10.3201/eid2011.140891.
139. Peralta, B., Casas, M., de Deus, N., Martín, M., Ortuño, A., Pérez-Martín, E., Pina, S. & Mateu, E. (2009). *Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA.* Veterinary Microbiology, 137(1-2), 66–73. doi:10.1016/j.vetmic.2009.01.006.
140. Pérez-Gracia, M. T., Mateos, M. L., Galiana, C., Fernández-Barredo, S., García, A., Gómez, M. T., & Moreira, V. (2007). *Autochthonous hepatitis E infection in a slaughterhouse worker.* The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 77(5), 893–896. doi:10.4269/ajtmh.2007.77.893.
141. Pérez-Gracia, M. T., Suay-García, B., García, M., & Mateos-Lindemann, M. L. (2016). *Hepatitis E: latest developments in knowledge.* Future Microbiology, 11(6), 789–808. doi:10.2217/fmb-2016-0012.
142. Petrovic, T., Prodanov, J., Lazic, S. (2008). *First preliminary results on the presence of hepatitis E virus in swine population in Serbia.* Symposium on Current Developments in Food and Environmental Virology, Pisa, Italy, (pp. 52–53).
143. Petrović, T., Lupulović, D., Jiménez de Oya, N., Vojvodić, S., Blázquez, A.-B., Escribano-Romero, E., Martin-Acebes, M., Potkonjak, A., Milošević, V., Lazić & Saiz, J.-C. (2014). *Prevalence*

- of hepatitis E virus (HEV) antibodies in Serbian blood donors. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 8(10), 1322–1327. doi:10.3855/jidc.4369.
144. Pischke, S., Suneetha, P. V., Baechlein, C., Barg-Hock, H., Heim, A., Kamar, N. i sar. (2010). *Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients*. *Liver Transplantation*, 16(1), 74–82. doi:10.1002/lt.21958.
145. Porea, D., Anita, A., Demange, A., Raileanu, C., Oslobanu Ludu, L., Anita, D., Savuta, G. & Pavio, N. (2017). *Molecular detection of Hepatitis E virus in wild boar population in eastern Romania*. *Transboundary and Emerging Diseases*, 65(2), 527–533. doi:10.1111/tbed.12736.
146. Prpic, J. (2016). *Detection and molecular characterization of hepatitis E virus in humans, swine and wild boars in Croatia*. *Virology & Mycology*, 05(01). doi:10.4172/2161-0517.c1.008.
147. Prpić, J., Černi, S., Škorić, D., Keros, T., Brnić, D., Cvetnić, Ž., & Jemeršić, L. (2015). *Distribution and molecular characterization of hepatitis E virus in domestic animals and wildlife in Croatia*. *Food and Environmental Virology*, 7(3), 195–205. doi:10.1007/s12560-015-9193-5.
148. Purcell, R. H. i S. U. Emerson (2008): *Hepatitis E: An emerging awareness of an old disease*. *J Hepatolog*, 48(3), 494–503. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2007.12.008>
149. Purcell, R. H., S. U. Emerson (2001): *Hepatitis E virus*. In *Fields Virology*, 4th edn, pp. 3051–3061. Edited by D. M. Knipe, P. M. Howley, D. E. Griffin, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman and S. E. Straus. Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins.
150. Raspor Lainšček, P., Toplak, I., & Kirbiš, A. (2017). *A comprehensive study of hepatitis E virus infection in pigs entering a slaughterhouse in Slovenia*. *Veterinary Microbiology*, 212, 52–58. doi:10.1016/j.vetmic.2017.11.002.
151. Renou, C., A. M. Roque-Afonso i N. Pavio (2014): *Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France*. *Emerging infectious diseases*, 20(11), 1945–1947. doi:10.3201/eid2011.140791.
152. Renou, C., Cadranel, J.-F., Bourlière, M., Halfon, P., Ouzan, D., Rifflet, H. i sar. (2007). *Possible zoonotic transmission of hepatitis E from pet pig to its owner*. *Emerging Infectious Diseases*, 13(7), 1094–1096. doi:10.3201/eid1307.070063.
153. Reuter, G., Fodor, D., Forgách, P., Kátai, A., & Szűcs, G. (2009). *Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary*. *Journal of Clinical Virology*, 44(4), 277–281. doi:10.1016/j.jcv.2009.01.008.
154. Reuter, G., Fodor, D., Kátai, A., & Szűcs, G. (2006). *Identification of a novel variant of human hepatitis E virus in Hungary*. *Journal of Clinical Virology*, 36(2), 100–102. doi:10.1016/j.jcv.2006.01.016.
155. Reyes, G., Purdy, M., Kim, J., Luk, K., Young, L., Fry, K., & Bradley, D. (1990). *Isolation of a cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis*. *Science*, 247(4948), 1335–1339. doi:10.1126/science.2107574.
156. Ricci, A., A. Allende, D. Bolton, M. Chemaly, R. Davies i sar. (2017): *Public health risks associated with hepatitis E virus (HEV) as a food-borne pathogen*. *EFSA Journal*, 15(7), e04886, doi:doi:10.2903/j.efsa.2017.4886.
157. Riveiro-Barciela, M., Mínguez, B., Gironés, R., Rodríguez-Frías, F., Quer, J., & Buti, M. (2015). *Phylogenetic demonstration of hepatitis E infection transmitted by pork meat ingestion*. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 49(2), 165–168. doi:10.1097/mcg.000000000000113.
158. Riveiro-Barciela, M., Rodríguez-Frías, F., & Buti, M. (2012). *Hepatitis E: Dimensión del problema en España*. *Gastroenterología y Hepatología*, 35(10), 719–724. doi:10.1016/j.gastrohep.2012.03.003.
159. Rivero-Juarez, A., M. Frias, A. Martinez-Peinado, M. A. Risalde, D. Rodriguez-Cano, A. Camacho, García-Bocanegra, I., Cuenca-Lopez, F., Gomes-Villamandos, J. & Rivero, A. (2017): *Familial hepatitis E outbreak linked to wild boar meat consumption*. *Zoonoses. Public Health*, 64(7), 561-565, doi:10.1111/zph.12343.
160. Rivero-Juarez, A., Risalde, M. A., Frias, M., García-Bocanegra, I., Lopez-Lopez, P., Cano-Terriza, D., Camahco, A., Jimenez-Ruiz, S., Gomes-Villamandos, J. & Rivero, A. (2018). *Prevalence*

- of hepatitis E virus infection in wild boars from Spain: a possible seasonal pattern?* BMC Veterinary Research, 14(1). doi:10.1186/s12917-018-1377-4.
161. Rizzetto, M., Hoyer, B., Canese, M. G., Shih, J. W., Purcell, R. H., & Gerin, J. L. (1980). *delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 77(10), 6124–6128. doi:10.1073/pnas.77.10.6124.
162. Rose, N., & Pavio, N. (2014). *Epidemiology of hepatitis E virus in pigs: the way forward to limit consumer exposure (Conference poster)*. Journées de la Recherche Porcine en France, 46, 159–168.
163. Rose, N., Lunazzi, A., Dorenlor, V., Merbah, T., Eono, F., Eloit, M., Madec, F. & Pavio, N. (2011). *High prevalence of hepatitis E virus in French domestic pigs*. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 34(5), 419–427. doi:10.1016/j.cimid.2011.07.003.
164. Ruggeri M., Di Bartolo I., Ostanell, F., & Trevisani M. (2013). *Epidemiology of the human HEV infection*. In *hepatitis E virus: An emerging zoonotic and foodborne pathogen* (pp. 11–21): New York: Springer. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-7522-4>.
165. Rutjes, S. A., Lodder, W. J., Bouwknegt, M., & de Roda Husman, A. M. (2007). *Increased Hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR*. Journal of Virological Methods, 143(1), 112–116. doi:10.1016/j.jviromet.2007.01.030.
166. Rutjes, S. A., Lodder-Verschoor, F., Lodder, W. J., van der Giessen, J., Reesink, H., Bouwknegt, M., & de Roda Husman, A. M. (2010). *Seroprevalence and molecular detection of hepatitis E virus in wild boar and red deer in The Netherlands*. Journal of Virological Methods, 168(1-2), 197–206. doi:10.1016/j.jviromet.2010.05.014.
167. Saad, M. D., Hussein, H. A., Bashandy, M. M., Kamel, H. H., Earhart, K. C., Fryauff, D. J., Younan, M. & Mohamed, A. H. (2007). *Hepatitis E virus infection in work horses in Egypt*. Infection, Genetics and Evolution, 7(3), 368–373. doi:10.1016/j.meegid.2006.07.007.
168. Said, B., Ijaz, S., Chand, M. A., Kafatos, G., Tedder, R., & Morgan, D. (2013). *Hepatitis E virus in England and Wales: indigenous infection is associated with the consumption of processed pork products*. Epidemiology and Infection, 142(7), 1467–1475. doi:10.1017/s0950268813002318.
169. Said, B., Ijaz, S., Kafatos, G., Booth, L., Thomas, H. L., Walsh, A., Ramsay, M. & Morgan, D. (2009). *Hepatitis E outbreak on cruise ship*. Emerging Infectious Diseases, 15(11), 1738–1744. doi:10.3201/eid1511.091094.
170. Salines, M., Andraud, M. & Rose, N. (2017). *From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review*. Vet Res 48, 31. <https://doi.org/10.1186/s13567-017-0436-3>.
171. Salines, M., Rose, N., & Andraud, M. (2019). *Tackling hepatitis E virus spread and persistence on farrow-to-finish pig farms: Insights from a stochastic individual-based multi-pathogen model*. Epidemics, 100369. doi:10.1016/j.epidem.2019.100369.
172. Schemmerer, M., Rauh, C., Jilg, W., & Wenzel, J. J. (2016). *Time course of hepatitis E-specific antibodies in adults*. Journal of Viral Hepatitis, 24(1), 75–79. doi:10.1111/jvh.12621.
173. Smego, R. A., & Khaliq, A. A. (1988). *Epidemic non-A, non-B Hepatitis in Urban Karachi, Pakistan*. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 38(3), 628–632. doi:10.4269/ajtmh.1988.38.628.
174. Smith, D. B., P. Simmonds, S. Jameel, S. U. Emerson, T. J. Harrison, X. J. Meng i sar. (2014): *Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae*. J Gen Virol, 95(Pt 10), 2223–2232, doi:10.1099/vir.0.068429-0.
175. Smith, D. B., Simmonds, P., Izopet, J., Oliveira-Filho, E. F., Ulrich, R. G., Johne, R., et al. (2016). *Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes*. J Gen Virol, 97(3), 537–542, doi:10.1099/jgv.0.000393.
176. Sonoda, H., Abe, M., Sugimoto, T., Sato, Y., Bando, M., Fukui, E., Mizuo, H., Takahashi, M., Nishizawa, T. & Okamoto, H. (2004). *Prevalence of hepatitis E virus (HEV) infection in wild*

- boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*, 42(11), 5371–5374. doi:10.1128/jcm.42.11.5371-5374.2004.
177. Spancerniene, U., Grigas, J., Buitkuvienė, J., Zymantiene, J., Juozaitiene, V., Stankeviciute, M., Razukevicius, D., Zienius, D. & Stankevicius, A. (2019). *Correction to: Prevalence and phylogenetic analysis of hepatitis E virus in pigs, wild boars, roe deer, red deer and moose in Lithuania*. *Acta Veterinaria Scandinavica*, 61(1). doi:10.1186/s13028-019-0443-7
178. Sridhar, S., S. K. P. Lau, , P. C. Y. Woo (2015). *Hepatitis E: A disease of reemerging importance*. *Journal of the Formosan Medical Association*, 114(8), 681–690. doi:10.1016/j.jfma.2015.02.003.
179. Steyer, A., Naglič, T., Močilnik, T., Poljšak-Prijatelj, M., & Poljak, M. (2011). *Hepatitis E virus in domestic pigs and surface waters in Slovenia: Prevalence and molecular characterization of a novel genotype 3 lineage*. *Infection, Genetics and Evolution*, 11(7), 1732–1737. doi:10.1016/j.meegid.2011.07.007.
180. Szabo, K., Trojnar, E., Anheyer-Behmenburg, H., Binder, A., Schotte, U., Ellerbroek, L., et al. (2015). *Detection of hepatitis E virus RNA in raw sausages and liver sausages from retail in Germany using an optimized method*. *Int J Food Microbiol*, 215, 149-156, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2015.09.013.
181. Tam, A. W., Smith, M. M., Guerra, M. E., Huang, C.-C., Bradley, D. W., Fry, K. E., & Reyes, G. R. (1991). *Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome*. *Virology*, 185(1), 120–131. doi:10.1016/0042-6822(91)90760-9.
182. Tarantino, G., Surace, G., Marinelli, K., Marzioni, M., Malena, A., Menzo, S., & Benedetti, A. (2016). *Hepatitis E in a region of Italy: An autochthonous emerging infection?* *Journal of Hepatology*, 64(2), S458. doi:10.1016/s0168-8278(16)00765-0.
183. Teixeira, J., Mesquita, J. R., Pereira, S. S., Oliveira, R. M. S., Abreu-Silva, J., Rodrigues, A., Myrmel, M., Stene-Johansen, K., Overbo, J., Goncalves, G. & Nascimento, M. S. J. (2016). *Prevalence of hepatitis E virus antibodies in workers occupationally exposed to swine in Portugal*. *Medical Microbiology and Immunology*, 206(1), 77–81. doi:10.1007/s00430-016-0484-8.
184. Temmam, S., Besnard, L., Andriamandimby, S.F., Foray, C., Rasamoelina-Andriamanivo, H., Héraud, J.M., Cardinale, E., Dellagi, K., Pavio, N., Pascalis, H. & Porphyre, V. (2013). *High prevalence of hepatitis E in humans and pigs and evidence of genotype-3 virus in swine, Madagascar*. *Am J Trop Med Hyg*. Feb;88(2) 329-338. doi:10.4269/ajtmh.2012.12-0615.
185. *The European Union One Health 2018 Zoonoses Report* (2019). *EFSA Journal*, 17(12). doi:10.2903/j.efsa.2019.5926.
186. Thiry, D., Mauroy, A., Saegerman, C., Thomas, I., Wautier, M., Miry, C., Czaplicki, G., Berkvens, D., Praet, N., Poel, W., Cariolet, R., Brochier, B. & Thiry, E. (2014). *Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium*. *Veterinary Microbiology*, 172(3-4), 407–414. doi:10.1016/j.vetmic.2014.06.004.
187. Tsachev, I., Pepovich, R., Marutsov, P., Baymakova, M., Pishmisheva, M., Pekova, L., & Gospodinova, K. (2019). *Seroprevalence of hepatitis E virus infection in pigs from Southern Bulgaria: a preliminary report*. *International Journal of Infectious Diseases*, 79, 63. doi:10.1016/j.ijid.2018.11.163.
188. Velazquez, O. (1990). *Epidemic transmission of enterically transmitted non-A, non-B hepatitis in Mexico, 1986-1987*. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 263(24), 3281. doi:10.1001/jama.1990.03440240071018.
189. Walachowski, S., Dorenlor, V., Lefevre, J., Lunazzi, A., Eono, F., Merbah, T., Eveno, E., Pavio, N. & Rose, N. (2013). *Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: a retrospective study of 90 swine farms in France*. *Epidemiology and Infection*, 142(9), 1934–1944. doi:10.1017/s0950268813003063.
190. Wenzel, J. J., Preiß, J., Schemmerer, M., Huber, B., Plentz, A., & Jilg, W. (2011). *Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates*. *Journal of Clinical Virology*, 52(1), 50–54. doi:10.1016/j.jcv.2011.06.006.

191. WHO. (2016). *Hepatitis E vaccine: WHO position paper, May 2015 – Recommendations*. Vaccine, 34(3), 304–305. doi:10.1016/j.vaccine.2015.07.056.
192. Wichmann, O., Schimanski, S., Koch, J., Kohler, M., Rothe, C., Plentz, A., Jilg, W. & Stark, K. (2008). *Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany*. The Journal of Infectious Diseases, 198(12), 1732–1741. doi:10.1086/593211.
193. Widen F, Sundqvist L, Matyi-Toth A, Metreveli G, Belak S, Hallgren G, Norder H (2011). *Molecular epidemiology of hepatitis E virus in humans, pigs and wild boars in Sweden*. Epidemiology and Infection, 139(3), 361–371. doi:10.1017/s0950268810001342.
194. Widen, F. (2016): *Hepatitis E as a zoonosis*. Adv Exp Med Biol, 948, 61-71, doi:10.1007/978-94-024-0942-0_4.
195. Wilhelm, B., Leblanc, D., Leger, D., Gow, S., Deckert, A., Pearl, D. L., Friendship, R., Raji, A., Houde, A., & McEwen, S. (2016). *Farm-level prevalence and risk factors for detection of hepatitis E virus, porcine enteric calicivirus, and rotavirus in Canadian finisher pigs*. Canadian journal of veterinary research, 80, 95-105.
196. Wong, D., Purcell, R., Mandyam Ammanjee Sreenivasan, Rama Prasad, S., & Pavri, K. (1980). *Epidemic and endemic hepatitis in india: evidence for a non-a, non-b hepatitis virus aetiology*. The Lancet, 316(8200), 876–879. doi:10.1016/s0140-6736(80)92045-0.
197. Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tsang, A. K. L., Joseph, M., Wong, E. Y. M., Tang, Y., Sivakumar, S., Xei, J., Bai, R., Wernery, R., Wernery, U. & Yuen, K.-Y. (2014). *New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East*. Emerging Infectious Diseases, 20(6), 1044–1048. doi:10.3201/eid2006.140140.
198. Wu, X., Chen, P., Lin, H., Hao, X., & Liang, Z. (2016). *Hepatitis E virus: Current epidemiology and vaccine*. Human Vaccines & Immunotherapeutics, 12(10), 2603–2610. doi:10.1080/21645515.2016.1184806.
199. Xing, L., Kato, K., Li, T., Takeda, N., Miyamura, T., Hammar, L., & Cheng, R. H. (1999). *Recombinant hepatitis E capsid protein self-assembles into a dual-domain T = 1 particle presenting native virus epitopes*. Virology, 265(1), 35–45. doi:10.1006/viro.1999.0005.
200. Yarbough, P.O., Tam, A.W., Fry, Kirk, Krawczynski, Kris, McCaustland, K.A., Bradley, D.W. & Reyes, G.R. (1991). *Hepatitis E virus: Identification of type-common epitopes*. Journal of virology. 65. 5790-7.
201. Yazaki, Y. (2003). *Sporadic acute or fulminant hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food*. Journal of General Virology, 84(9), 2351–2357. doi:10.1099/vir.0.19242-0.
202. Zaki, M. E. S., Aal, A. A. E., Badawy, A., El- Deeb, D. R., & El-Kheir, N. Y. A. (2013). *Clinicolaboratory study of mother-to-neonate transmission of hepatitis E virus in Egypt*. American Journal of Clinical Pathology, 140(5), 721–726. doi:10.1309/ajcpt55tdmjnppllv.
203. Zhang, W., Shen, Q., Mou, J., Yang, Z. B., Yuan, C. L., Cui, L., Zhu, G., Hua, X., Xu, C. & Hu, J. (2008). *Cross-species infection of hepatitis E virus in a zoo-like location, including birds*. Epidemiology and Infection, 136(8), 1020–1026. doi:10.1017/s095026880700965x.
204. Zhao, C., Ma, Z., Harrison, T. J., Feng, R., Zhang, C., Qiao, Z., Fan, J., Ma, H., Li, M., Song, A. & Wang, Y. (2009). *A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China*. Journal of Medical Virology, 81(8), 1371–1379. doi:10.1002/jmv.21536.
205. Zhu, F.-C., Huang, S.-J., Wu, T., Zhang, X.-F., Wang, Z.-Z., Ai, X., Yan, Q., Yang, C., Cai, J., Jiang, H., Wang, Y., Ng, M., Zhang, J. & Xia, N.-S. (2014). *Epidemiology of zoonotic hepatitis E: A community-based surveillance study in a rural population in China*. PLoS ONE, 9(1), e87154. doi:10.1371/journal.pone.0087154.
206. Žele, D., Barry, A. F., Hakze-van der Honing, R. W., Vengušt, G., & van der Poel, W. H. M. (2016). *Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies and first detection of Hepatitis E virus in wild boar in Slovenia*. Vector-Borne and Zoonotic Diseases, 16(1), 71–74. doi:10.1089/vbz.2015.1819.

BIOGRAFIJA

Lazar Z. Milojević rođen je 08.11.1991. godine u Beogradu. Srednju školu (Poljoprivredna škola i škola za proizvodnju i preradu hrane – veterinarski tehničar) završio je u Topoli. Fakultet veterinarske medicine Univerziteta u Beogradu, upisao je školske 2010/2011 godine, a diplomirao 20. septembra 2016. godine sa prosečnom ocenom 9,13. Tokom studija bio je stipendista Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja i gradske opštine Mladenovac. Doktorske akademske studije upisao je školske 2016/2017 godine na Fakultetu veterinarske medicine, Univerziteta u Beogradu. Na doktorskim akademskim studijama položio je sve predviđene ispite sa prosečnom ocenom 9,73.

Pripravnički staž obavio je u periodu od 01.10.2016. do 30.09.2017. god. u Institutu za higijenu i tehnologiju mesa. U toku pripravničkog staža obučavao se u obavljanju poslova i aktivnosti iz delokruga rada Odeljenja za prijem uzoraka i izdavanje laboratorijskih izveštaja, Odeljenja za mikrobiološka i molekularno-biološka ispitivanja i Odeljenja za senzorna i fizička ispitivanja sa parazitologijom. Lazar Milojević trenutno je raspoređen na Odeljenju za mikrobiološka i molekularno-biološka ispitivanja kao mlađi asistent, gde obavlja poslove i zadatke iz delokruga odeljenja. Tokom svog dosadašnjeg rada, Lazar Milojević bio je angažovan na poslovima ispitivanja bezbednosti i kvaliteta namirnica animalnog porekla, kao i na poslovima naučno - stručne saradnje sa industrijom mesa.

Učestvovao je na nekoliko naučnih i inovacionih projekata. Lazar je bio deo primarnog tima u „Huo-Yan“ Nacionalnoj laboratoriji za molekularnu detekciju infektivnih agenasa Beograd u borbi protiv epidemije prouzrokovane virusom SARS-Cov2. Bio je učesnik letnje škole u Parmi koju organizuje Evropska agencija za bezbednost hrane (EFSA) 2019. godine. Aktivno je učestvovao u organizaciji naučnih međunarodnih skupova kao član organizacionog odbora. Takođe, Lazar je učestvovao u više eksternih i internih obuka i kurseva.

Baveći se naučnoistraživačkim radom, kandidat je učestvovao, kao autor ili koautor u objavljivanju preko 15 naučnih radova, od kojih su 3 objavljena u međunarodnim naučnim časopisima sa SCI liste.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Потписани-а Лазар З. Милојевић

број уписа 2016/5008

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

**„Идентификација и филогенетска анализа хепатитис Е вируса код свиња
на кланицама у Србији“**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора Лазар З. Милојевић

Број уписа 2016/5008

Студијски програм Докторске академске студије

Наслов рада „Идентификација и филогенетска анализа хепатитис Е вируса код свиња на кланицама у Србији“

Ментор 1: Др Мирјана Димитријевић, редовни професор

Ментор 2: Др Бранко Велебит, научни саветник

Потписани Лазар З. Милојевић

изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, _____

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Идентификација и филогенетска анализа хепатитис Е вируса код свиња на кланицама у Србији“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на полеђини листа).

Потпис докторанда

У Београду, _____

1. Ауторство - Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце, чак и у комерцијалне сврхе. Ово је најслободнија од свих лиценци.
2. Ауторство – некомерцијално. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела.
3. Ауторство - некомерцијално – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела. У односу на све остале лиценце, овом лиценцом се ограничава највећи обим права коришћења дела.
4. Ауторство - некомерцијално – делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца не дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада.
5. Ауторство – без прераде. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, без промена, преобликовања или употребе дела у свом делу, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела.
6. Ауторство - делити под истим условима. Дозвољаваате умножавање, дистрибуцију и јавно саопштавање дела, и прераде, ако се наведе име аутора на начин одређен од стране аутора или даваоца лиценце и ако се прерада дистрибуира под истом или сличном лиценцом. Ова лиценца дозвољава комерцијалну употребу дела и прерада. Слична је софтверским лиценцама, односно лиценцама отвореног кода.